

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 29 日 (29.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/090564 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, A61K 31/7088, 38/00, 48/00, A61P 7/02, 9/00, C07K 14/475, C12N 5/10

(74) 代理人: 山本 秀策, 外(YAMAMOTO, Shusaku et al.); 〒5406015 大阪府大阪市中央区城見一丁目 2 番 2 7 号 クリスタルタワー 1 5 階 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/004832

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 17 日 (17.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-081688 2004 年 3 月 19 日 (19.03.2004) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ジェノミディア株式会社 (GenomIdea, Inc.) [JP/JP]; 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目 7 番 1 5 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西川 智之 (NISHIKAWA, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒5620031 大阪府箕面市小野原東 5-4 フォルク北千里 B 棟 1 0 4 Osaka (JP). 中神 啓徳 (NAKAGAMI, Hironori) [JP/JP]; 〒5670048 大阪府茨木市北春日丘 2 丁目 1 0-4-2 5 Osaka (JP). 金田 安史 (KANEDA, Yasufumi) [JP/JP]; 〒5620031 大阪府箕面市小野原東 6-1 2-8 Osaka (JP).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENE PROMOTING VASCULAR ENDOTHELIAL CELL GROWTH

(54) 発明の名称: 血管内皮増殖促進遺伝子

(57) Abstract: It is intended to provide a novel polypeptide having an activity of growing vascular endothelial cells, an activity of promoting transcription form c-fos promoter, an activity of promoting transcription from VEGF promoter and/or an angiogenic activity; a polynucleotide encoding this polypeptide; the above polypeptide and/or a pharmaceutical composition containing the polypeptide for treating a disease selected from the group consisting of obstructive arteriosclerosis, Buerger's disease, peripheral vascular disorder, angina, myocardial infarction, brain infarction, ischemic heart disease and ischemic brain disease; a method of treating these diseases; and an antibacterial composition. The above problems can be solved by isolating a novel peptide having the above-described activities and a nucleotide encoding this peptide.

(57) 要約: 本発明は、血管内皮細胞増殖活性、c-fos プロモーターからの転写促進活性、VEGF プロモーターからの転写促進活性、および/または血管新生活性を有する新規のポリペプチド、およびそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することを課題とする。また、本発明は、これらポリペプチドおよび/またはポリペプチドを含む、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、末梢血管病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置のための薬学的組成物、ならびにこれら疾患の処置方法を提供することを課題とする。さらに、抗菌組成物を提供することも、本発明の課題である。上記活性を有する新規ペプチド、およびそのペプチドをコードするヌクレオチドを単離することによって、上記課題が解決した。

WO 2005/090564 A1

明 細 書

血管内皮増殖促進遺伝子

技術分野

- [0001] 本発明は、血管内皮細胞増殖活性、c-fosプロモーターからの転写促進活性、VEGFプロモーターからの転写促進活性、および／または血管新生活性を有する新規のポリペプチド、およびそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。

背景技術

- [0002] 血管新生を促進することによって、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、ならびに、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞などの虚血性心疾患・脳疾患を処置し得る(非特許文献1〜7)。
- [0003] 危険な四肢の虚血は、毎年百万人当たり500〜1000人の割合で発生すると推定されている。これらの患者の大多数は、動脈閉塞が広い部位にわたっているために、手術あるいは経皮的な血管再生によって治療することができない。従って、血管新生のような新しい治療法が、このような患者の処置において重要になると考えられる。血管新生を促進するタンパク質としては、HGF(肝細胞増殖因子)やVEGF(血管内皮細胞増殖因子)(特許文献1および特許文献2)等が公知である。しかし、VEGFには、浮腫を起こしやすいという欠点がある。危険な四肢の虚血や心筋虚血を有する患者において、内因性のVEGFのレベルを上げるために遺伝子導入を行うという方法が研究されている。しかし、これらの患者に対するVEGF治療は、治療に付随して、手足に浮腫を生じることがある。また、VEGFは、虚血脳において血液脳関門の漏れも報告されている。また、HGFの投与により細胞の遊走能が上昇するが、そこに癌があれば転移を誘発する危険性もあるなどの欠点を有する。そこで、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、ならびに、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞などの虚血性心疾患・脳疾患の処置のための、新規ポリペプチドが求められている。

特許文献1:特表平10-51071

特許文献2:特表2001-517075

非特許文献1:血管新生療法―基礎と臨床―、内田康美・小塚裕編、真興交易株式会

社 医書出版部、1997年5月25日

非特許文献2:The FASEB J. 17 779-781, 2003

非特許文献3:Circulation 97, 1114-1123, 1998

非特許文献4:The Lancet, 348, 370-374, 1996

非特許文献5:Circulation 105, 1491-96, 2002

非特許文献6:Gene Therapy 7, 417-427, 2000

非特許文献7:Circulation 109, 424-431, 2004

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0004] 本発明は、血管内皮細胞増殖活性、c-fosプロモーターからの転写促進活性、VEGFプロモーターからの転写促進活性、および／または血管新生活性を有する新規のポリペプチド、およびそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することを課題とする。また、本発明は、これらポリペプチドおよび／またはポリペプチドを含む、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、末梢血管病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置のための薬学的組成物、ならびにこれら疾患の処置方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0005] 本発明は、血管内皮増殖促進因子は血管新生を促す可能性が高いという知見に基づき、新規のスクリーニング方法を用いることによって、新規のペプチドをコードする核酸を単離することによって完成された。
- [0006] したがって、本発明は、以下を提供する。

1. 以下:

(a) 配列番号1に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を含む、ポリヌクレオチド;

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする配列を含む、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチ

ドをコードする、ポリヌクレオチド、;

(d) (a) ~ (c) のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド; および

(e) (a) ~ (c) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなるポリヌクレオチド、
からなる群から選択されるポリヌクレオチドであって、ここで、前記ポリヌクレオチドは、
血管内皮細胞増殖活性、c-fosプロモーターからの転写促進活性、VEGFプロモーターからの転写促進活性、および血管新生活性からなる群から選択される活性を有するペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

2. 配列番号1に記載の塩基配列を有する、項目1に記載のポリヌクレオチド。

3. 配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードする、項目1に記載のポリヌクレオチド。

4. 血管新生活性を有するペプチドをコードする、項目1に記載のポリヌクレオチド。

5. 血管内皮細胞増殖活性を有するペプチドをコードする、項目1に記載のポリヌクレオチド。

6. 項目1に記載のポリヌクレオチドを含有する、血管新生のための薬学的組成物。

7. 項目1に記載のポリヌクレオチドを含有する、血管内皮細胞増殖のための薬学的組成物。

8. 項目1に記載のポリヌクレオチドを含有する、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置のための薬学的組成物。

9. 組織の血管新生を生じさせる方法であって、以下;

(1) 血管新生を生じさせる組織を提供する工程; および

(2) 該血管内皮細胞に項目1に記載のポリヌクレオチドを含む核酸を導入する工程、
を包含する、方法。

10. 前記血管新生は、インビボ、エキソビボまたはインビトロで行われる、項目9に記載の方法。

11. 前記組織は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾

患を含む状態にある、項目9に記載の方法。

12. 血管内皮細胞を増殖させる方法であって、以下；

(1) 血管内皮細胞を提供する工程；および

(2) 該血管内皮細胞に項目1に記載のポリヌクレオチドを含む核酸を導入する工程、を包含する、方法。

13. 前記血管内皮細胞の増殖は、インビボ、エキソビボまたはインビトロで行われる、項目12に記載の方法。

14. 前記血管内皮細胞は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患を含む組織中にある、項目12に記載の方法。

15. 項目1に記載のポリヌクレオチドを含む、プラスミド。

16. 項目1に記載のポリヌクレオチドを含む、遺伝子導入ベクター。

17. 血管内皮細胞を増殖させる方法であって、以下；

(1) 血管内皮細胞を提供する工程；および

(2) 該血管内皮細胞に項目16に記載の遺伝子導入ベクターを接触させる工程、を包含する、方法。

18. 項目1に記載のポリヌクレオチドによってコードされる、ポリペプチド。

19. 以下：

(a) 配列番号1に記載の塩基配列またはそのフラグメントによってコードされるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド；

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む、ポリペプチド、

(c) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチド；および

(d) (a) ~ (c) のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなる、ポリペプチド、からなる群から選択されるポリペプチドであって、ここで、前記ポリペプチドは、血管内皮細胞増殖活性、c-fos

プロモーターからの転写促進活性、VEGFプロモーターからの転写促進活性、および血管新生活性からなる群から選択される活性を有する、ポリペプチド。

20. 配列番号1に記載の塩基配列によってコードされる、項目19に記載のポリペプチド。

21. 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する、項目19に記載のポリペプチド。

22. 血管新生活性を有する、項目19に記載のポリペプチド。

23. 血管内皮細胞増殖活性を有する、項目19に記載のポリペプチド。

24. 項目19に記載のポリペプチドを含有する、血管新生のための薬学的組成物。

25. 項目19に記載のポリペプチドを含有する、血管内皮細胞増殖のための薬学的組成物。

26. 項目19に記載のポリペプチドを含有する、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置のための薬学的組成物。

27. 組織の血管新生を生じる方法であって、以下；

(1) 血管新生する組織を提供する工程；および

(2) 該血管内皮細胞に項目19に記載のポリペプチドを接触させる工程、を包含する、方法。

28. 前記血管新生は、インビボ、エキソビボまたはインビトロで行われる、項目27に記載の方法。

29. 前記組織は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患を含む状態にある、項目27に記載の方法。

30. 血管内皮細胞を増殖させる方法であって、以下；

(1) 血管内皮細胞を提供する工程；および

(2) 該血管内皮細胞に項目18に記載のポリペプチドを接触させる工程、を包含する、方法。

31. 前記血管内皮細胞の増殖は、インビボ、エキソビボまたはインビトロで行われる、項目30に記載の方法。

32. 前記血管内皮細胞は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患を含む組織中にある、項目30に記載の方法。

33. 項目1に記載のポリヌクレオチドを含む抗菌剤。

34. 項目18または19に記載のポリペプチドを含む抗菌剤。

35. 項目1に記載のポリヌクレオチドを含む、感染症を処置するための薬学的組成物。

36. 項目18または19に記載のポリペプチドを含む、感染症を処置するための薬学的組成物。

37. 項目1に記載のポリヌクレオチドを含む、IGF産生増強のための組成物。

38. 項目18または19に記載のポリペプチドを含む、IGF産生増強のための組成物。

発明の効果

[0007] 本発明によって、血管内皮細胞増殖活性、c-fosプロモーターからの転写促進活性、VEGFプロモーターからの転写促進活性、および血管新生活性の少なくとも1つの活性を有するポリペプチド、およびそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。

[0008] さらに、本発明によって、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、末梢血管病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置方法、ならびに処置のための薬学的組成物もまた、提供される。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、本発明の核酸の単離のスキームである。

[図2]図2は、本発明において単離された核酸のc-fosプロモーターアッセイの結果を示す図である。

[図3]図3は、本発明において単離されたクローンp3743の、c-fosプロモーターアッセイおよびVEGFプロモーターアッセイの結果である。

[図4]図4は、ヒト大動脈内皮細胞およびヒト大動脈平滑筋細胞におけるMTSアッセイの結果である。

[図5]図5は、血管新生活性測定の結果を示す写真である。

[図6]図6は、血管新生定量ソフトによる画像解析を示す図である。

[図7]図7は、本発明の候補配列を模式的に示した図である。

[図8]図8は、p3743-f1およびp3743-f2のc-fosプロモーターアッセイを示す結果である。

[図9]図9は、ヒト大動脈血管内皮細胞の増殖に対するF2ペプチドの影響 (MTSアッセイ)を示す結果である。

[図10]図10は、種々の濃度のF2ペプチドの、内皮細胞増殖に対する影響を示す結果である。

[図11]図11は、種々の濃度のF2ペプチドの、内皮細胞増殖に対する影響を示す結果である。比較対照として、コントロールペプチドおよびVEGFの結果を示す。

[図12]図12は、F2ペプチドの、インビボでの血管新生促進活性を示す結果である。比較対照として、コントロールペプチドの結果を示す。

[図13]図13は、抗CD31抗体を用いる免疫染色を用いて、F2ペプチドの、インビボでの血管新生促進活性を示す結果である。比較対照として、ネガティブコントロール、コントロールペプチド、およびVEGFの結果を示す。

[図14]図14は、種々の濃度のF2ペプチドと、種々の濃度のLL-37ペプチドとの、内皮細胞増殖に対する影響を示す結果である。

[図15]図15は、種々の濃度のF2ペプチドと、種々の濃度のLL-37ペプチドとの、血管新生促進活性を示す結果である。

[図16]図16は、種々の増殖因子をコードするmRNA発現量に対する、F2ペプチドの影響を示す結果である。

配列表の説明

[0010] 配列番号1:血管新生活性を有する新規ペプチドF2をコードする核酸配列

配列番号2:血管新生活性を有する新規ペプチドF2のアミノ酸配列

配列番号3:プラスミドp3743のインサート配列配列番号4:血管新生活性を有する新規ペプチドF1をコードする核酸配列

配列番号5:血管新生活性を有する新規ペプチドF1のアミノ酸配列

配列番号6:内皮細胞の遊走活性測定のためのコントロールペプチド

発明を実施するための最良の形態

[0011] 以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞または形容詞(例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など)は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書(定義を含めて)が優先する。

[0012] (用語の定義)

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

[0013] 本明細書において遺伝子(例えば、核酸配列、アミノ酸配列など)の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。また、本明細書において配列(核酸配列、アミノ酸配列など)の同一性とは、2以上の対比可能な配列の、互いに対する同一の配列(個々の核酸、アミノ酸など)の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジেন্টな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。本明細書において、遺伝子(例えば、核酸配列、アミノ酸配列など)の「類似性」とは、上記相同性において、保存的置換をポジティブ(同一)とみなした場合の、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、保存的置換がある場合は、その保存的置換の存在に応じて相同性と類似性とは異なる。また、保存的置換がない場合は、相同性と類似性とは同じ数値を示す。

- [0014] 本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるFASTAを用い、デフォルトパラメータを用いて算出される。
- [0015] 本明細書において「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド（長さが n ）に対して、 $1 \sim n-1$ までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さは、上述のようにそれぞれアミノ酸または核酸の個数で表すことができるが、上述の個数は絶対的なものではなく、同じ機能を有する限り、上限または下限としての上述の個数は、その個数の上下数個（または例えば上下10%）のものも含むことが意図される。そのような意図を表現するために、本明細書では、個数の前に「約」を付けて表現することがある。しかし、本明細書では、「約」のあるなしはその数値の解釈に影響を与えないことが理解されるべきである。本明細書において有用なフラグメントの長さは、そのフラグメントの基準となる全長タンパク質の機能のうち少なくとも1つの機能が保持されているかどうかによって決定され得る。
- [0016] 本明細書において「単離された」生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子が天然に存在する生物体の細胞内の他の生物学的因子（例えば、核酸である場合、核酸以外の因子および目的とする核酸以外の核酸配列を含む核酸；タンパク質である場合、タンパク質以外の因子および目的とするタンパク質以外のアミノ酸配列を含むタンパク質など）から実質的に分離または精製されたものをいう。「単離された」核酸およびタンパク質には、標準的な精製方法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。したがって、単離された核酸およびタ

ンパク質は、化学的に合成した核酸およびタンパク質を包含する。

- [0017] 本明細書において「精製された」生物学的因子(例えば、核酸またはタンパク質など)とは、その生物学的因子に天然に随伴する因子の少なくとも一部が除去されたものをいう。したがって、通常、精製された生物学的因子におけるその生物学的因子の純度は、その生物学的因子が通常存在する状態よりも高い(すなわち濃縮されている)。
- [0018] 本明細書中で使用される用語「精製された」および「単離された」は、好ましくは少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、よりさらに好ましくは少なくとも95重量%、そして最も好ましくは少なくとも98重量%の、同型の生物学的因子が存在することを意味する。
- [0019] 本明細書で使用される場合、「遺伝子導入ベクター」および「遺伝子ベクター」は互換可能に使用される。「遺伝子導入ベクター」および「遺伝子ベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターをいう。「遺伝子導入ベクター」および「遺伝子ベクター」としては、「ウイルスエンベロープベクター」および「リボソームベクター」が挙げられるが、これらに限定されない。
- [0020] 本明細書で使用される場合、「ウイルスエンベロープベクター」とは、ウイルスエンベロープ中に外来遺伝子を封入したベクター、またはウイルスエンベロープ由来のタンパク質を含む成分中に外来遺伝子を封入したベクターをいう。遺伝子導入ベクターの調製のために使用されるウイルスとしては、野生型ウイルスであっても、組換え型ウイルスであってもよい。
- [0021] 本発明において、ウイルスエンベロープまたはウイルスエンベロープ由来タンパク質の調製のために使用されるウイルスとしては、レトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、バキュロウイルス科、およびヘパドナウイルス科からなる群から選択される科に属するウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、パラミクソウイルス科に属するウイルスが、より好ましくは、HVJ(センダイウイルス)が、用いられる。
- [0022] ウイルスエンベロープ由来タンパク質としては、例えば、HVJのFタンパク質、HNタ

ンパク質、NPタンパク質およびMタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

- [0023] 本明細書で使用される場合、「リポソームベクター」とは、リポソーム中に外来遺伝子を封入したベクターをいう。リポソームベクターの調製のために使用される脂質としては、例えば、DOPE (ジオレオイルホスファチジルエタノラミン) およびホスファチジルコリンなどの中性リン脂質、コレステロール、ホスファチジルセリンおよびホスファチジン酸などの負電荷リン脂質、ならびにDC-コレステロール (ジメチルアミノエタンカルバモイルコレステロール) およびDOTAP (ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパン) などの正電荷脂質が挙げられるが、これらに限定されない。
- [0024] 本明細書で使用される場合、「リポソーム」とは、脂質二重膜の一種である。例えば、レシチンのようなリン脂質を50% (重量比) 以上の水に、そのリン脂質固有のゲル-液晶相転移温度以上で懸濁すると脂質二重層からなる、内部に水相を有する閉鎖小胞が形成される。この小胞をリポソームという。二分子膜が何枚もタマネギ状に重なった多重膜リポソーム (MLV) と、膜が1枚のリポソームに大別される。後者はまた、ホスファチジルコリンのようなリン脂質のサスペンション (懸濁液) を、ミキサーで激しく攪拌して分散した後、超音波処理を行なうことによっても調製することが可能である。
- [0025] 膜が1枚のリポソームはさらに、その粒子径によって小さな単膜リポソーム (SUV) と大きな単膜リポソーム (LUV) とに分類される。MLVは、脂質薄膜に水を加えて機械的振動を与えることにより調製される。SUVは、MLVを超音波するか、または脂質と界面活性剤の混合溶液から界面活性剤を透析などで除去するなどによって調製される。また、これ以外にも、(1) SUVの凍結融解を繰り返して、LUVを調製する方法、(2) 酸性リン脂質でできたSUVを Ca^{2+} の存在下で融合させ、そしてこの Ca^{2+} をEDTA (エチレンジアミン四酢酸) で除去することにより調製する方法、(3) 脂質のエーテル溶液と水のエマルジョンからエーテルを留去しながら、相の転換を行ってLUVなどを調製する方法 (逆相蒸発法リポソーム; REV) が周知である。
- [0026] 本明細書で使用される場合、「不活性化」とは、ゲノムを不活性化したウイルスをいう。この不活性化ウイルスは、複製欠損である。好ましくは、この不活性化は、UV処理またはアルキル化剤による処理によって、なされる。

- [0027] 本明細書において、「HVJ」および「センダイウイルス」は、互換可能に用いられ得る。例えば、本明細書において「HVJのエンベロープ」と「センダイウイルスのエンベロープ」とは同一の意味を示す語句として用いられる。
- [0028] 本明細書において「センダイウイルス」とは、パラミクソウイルス科パラミクソウイルス属に属し、細胞融合作用をもつウイルスをいう。ウイルス粒子は、エンベロープをもち、直径150〜300nmの多形性を示す。ゲノムは、約15500塩基長のマイナス鎖RNAである。RNAポリメラーゼを持ち、熱に不安定で、ほとんどあらゆる種類の赤血球を凝集し、また溶血性を示す。
- [0029] 本明細書において、「HAU」とは、ニワトリ赤血球0.5%を凝集可能なウイルスの活性をいい、1 HAUは、ほぼ2400万ウイルス粒子に相当する(Okada, Y. ら、Biken Journal 4、209〜213、1961)。
- [0030] 本明細書において使用する場合、「抗菌剤」とは、原核生物、真菌からなる群から選択される生物の増殖を、停止、抑制、および／または遅延させる作用を有する薬剤をいう。本発明の抗菌剤が対象とする原核生物としては、Escherichia、Bacillus、Streptococcus、Staphylococcus、Haemophilus、Neisseria、Actinobacillus、Acinetobacter、Serratia、Brevibacterium、Corynebacterium、Microbacterium、およびPseudomonasからなる群から選択される属等に属する原核細胞が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗菌剤が対象とする真菌細胞としては、Saccharomyces、Schizosaccharomyces、Kluyveromyces、Trichosporon、Schwanniomyces、Candida、Pichiaなどに属する酵母菌株、ならびにNeurosporaに属する真菌からなる群から選択される属等に属する真菌が挙げられるが、これらに限定されない。
- [0031] 本明細書において使用する場合、「感染症」とは、哺乳動物のような高等動物において、原核生物、真菌からなる群から選択される生物の増殖によって引き起こされる疾患をいう。
- [0032] 本明細書において、「ストリンジेंटな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択

されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC(saline-sodium citrate)溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムである)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38, DNA Cloning 1:Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press(1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」とは、上記ハイブリダイズ条件下で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、本発明で具体的に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、好ましくは80%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

[0033] 本明細書において「高度にストリンジントな条件」は、核酸配列において高度の相補性を有するDNA鎖のハイブリダイゼーションを可能にし、そしてミスマッチを有意に有するDNAのハイブリダイゼーションを除外するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドのような変性剤の条件によって決定される。このようなハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する「高度にストリンジントな条件」の例は、0.0015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、65～68℃、または0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、および50% ホルムアミド、42℃である。このような高度にストリンジントな条件については、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Labora

tory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory (ColdSpring Harbor, N, Y. 1989); および Anderson et al.、Nucleic Acid Hybridization: a Practical approach, IV, IRL Press Limited (Oxford, England). Limited, Oxford, Englandを参照のこと。必要により、よりストリンジェントな条件(例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド、または他の変性剤)を、使用してもよい。他の薬剤が、非特異的なハイブリダイゼーションおよび/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少する目的で、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液に含まれ得る。そのような他の薬剤の例としては、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(NaDodSO_4 または SDS)、Ficoll、Denhardt 溶液、超音波処理されたサケ精子DNA(または別の非相補的DNA)および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた、使用され得る。これらの添加物の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH 6.8〜7.4で実施されるが; 代表的なイオン強度条件において、ハイブリダイゼーションの速度は、ほとんどpH独立である。Anderson et al.、Nucleic Acid Hybridization: a Practical Approach、第4章、IRL Press Limited (Oxford, England)を参照のこと。

[0034] DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さおよび塩基対不一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、当業者によって調整され得、これらの変数を適用させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にする。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の式によって概算され得る。

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{G} + \text{C}) - 600 / \text{N} - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、 $[\text{Na}^+]$ は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+Cは、ハイブリッド中の(グアニン+シトシン)塩基のパーセンテージである。不完全に一致したハイブリッドに関して、融解温度は、各1%不一致(ミスマッチ)に対して約1℃ずつ減少する。

- [0035] 本明細書において「中程度にストリンジントな条件」とは、「高度にストリンジントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が、形成し得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジントな条件」の例は、0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、50〜65℃、または0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、および20%ホルムアミド、37〜50℃である。例として、0.015Mナトリウムイオン中、50℃の「中程度にストリンジントな」条件は、約21%の不一致を許容する。
- [0036] 本明細書において「高度」にストリンジントな条件と「中程度」にストリンジントな条件との間に完全な区別は存在しないことがあり得ることが、当業者によって理解される。例えば、0.015Mナトリウムイオン（ホルムアミドなし）において、完全に一致した長いDNAの融解温度は、約71℃である。65℃（同じイオン強度）での洗浄において、これは、約6%不一致を許容にする。より離れた関連する配列を捕獲するために、当業者は、単に温度を低下させ得るか、またはイオン強度を上昇し得る。
- [0037] 約20ヌクレオチドまでのオリゴヌクレオチドプローブについて、1MNaClにおける融解温度の適切な概算は、 $T_m = (1\text{つのA-T塩基につき}2^\circ\text{C}) + (1\text{つのG-C塩基対につき}4^\circ\text{C})$ によって提供される。なお、6×クエン酸ナトリウム塩(SSC)におけるナトリウムイオン濃度は、1Mである(Suggsら、DevelopmentalBiology Using Purified Genes、683頁、BrownおよびFox(編)(1981)を参照のこと)。
- [0038] 配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントなどのタンパク質をコードする天然の核酸は、例えば、配列番号1の核酸配列の一部またはその改変体を含むPCRプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブを有するcDNAライブラリーから容易に分離される。配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントなどをコードする核酸は、本質的に1%ウシ血清アルブミン(BSA);500mMリン酸ナトリウム(NaPO_4);1mM EDTA;42℃の温度で7% SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に2×SSC(600mM NaCl;60mMクエン酸ナトリウム);50℃の0.1% SDSを含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジント条件下、さらに好ましくは本質的に50℃の温度での1%ウシ血清アルブミン(BSA);500mMリン酸ナトリウム(

NaPO₄); 15%ホルムアミド; 1mM EDTA; 7% SDS を含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に50℃の1×SSC(300mM NaCl; 30mM クエン酸ナトリウム); 1% SDSを含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジェント条件下、最も好ましくは本質的に50℃の温度での1%ウシ血清アルブミン(BSA); 200mM リン酸ナトリウム(NaPO₄); 15%ホルムアミド; 1mM EDTA; 7% SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に65℃の0.5×SSC(150mM NaCl; 15mM クエン酸ナトリウム); 0.1% SDSを含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジェント条件下に配列番号1に示す配列の1つまたはその一部とハイブリダイズし得る。

- [0039] 本明細書において配列(アミノ酸または核酸など)の「同一性」、「相同性」および「類似性」のパーセンテージは、比較ウィンドウで最適な状態に整列された配列2つを比較することによって求められる。ここで、ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の比較ウィンドウ内の部分には、2つの配列の最適なアライメントについての基準配列(他の配列に付加が含まれていればギャップが生じることもあるが、ここでの基準配列は付加も欠失もないものとする)と比較したときに、付加または欠失(すなわちギャップ)が含まれる場合がある。同一の核酸塩基またはアミノ酸残基がどちらの配列にも認められる位置の数を求めることによって、マッチ位置の数を求め、マッチ位置の数を比較ウィンドウ内の総位置数で割り、得られた結果に100を掛けて同一性のパーセンテージを算出する。検索において使用される場合、相同性については、従来技術において周知のさまざまな配列比較アルゴリズムおよびプログラムの中から、適当なものを用いて評価する。このようなアルゴリズムおよびプログラムとしては、TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTAおよびCLUSTALW(Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-2448、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(3):403-410、Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680、Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(3):403-410、

Altschul et al. , 1993, Nature Genetics 3:266–272)があげられるが、何らこれに限定されるものではない。特に好ましい実施形態では、従来技術において周知のBasic Local Alignment Search Tool(BLAST)(たとえば、Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2267–2268、Altschul et al. , 1990, J. Mol. Biol. 215:403–410、Altschul et al. , 1993, Nature Genetics 3:266–272、Altschul et al. , 1997, Nuc. Acids Res. 25:3389–3402を参照のこと)を用いてタンパク質および核酸配列の相同性を評価する。特に、5つの専用BLASTプログラムを用いて以下の作業を実施することによって比較または検索が達成され得る。

- [0040] (1) BLASTPおよびBLAST3でアミノ酸のクエリー配列をタンパク質配列データベースと比較;
- (2) BLASTNでヌクレオチドのクエリー配列をヌクレオチド配列データベースと比較;
- (3) BLASTXでヌクレオチドのクエリー配列(両方の鎖)を6つの読み枠で変換した概念的翻訳産物をタンパク質配列データベースと比較;
- (4) TBLASTNでタンパク質のクエリー配列を6つの読み枠(両方の鎖)すべてで変換したヌクレオチド配列データベースと比較;
- (5) TBLASTXでヌクレオチドのクエリ配列を6つの読み枠で変換したものを、6つの読み枠で変換したヌクレオチド配列データベースと比較。
- [0041] BLASTプログラムは、アミノ酸のクエリ配列または核酸のクエリ配列と、好ましくはタンパク質配列データベースまたは核酸配列データベースから得られた被検配列との間で、「ハイスコアセグメント対」と呼ばれる類似のセグメントを特定することによって相同配列を同定するものである。ハイスコアセグメント対は、多くのものが従来技術において周知のスコアリングマトリックスによって同定(すなわち整列化)されると好ましい。好ましくは、スコアリングマトリックスとしてBLOSUM62マトリックス(Gonnet et al. , 1992, Science 256:1443–1445、Henikoff and Henikoff, 1993, Proteins 17:49–61)を使用する。このマトリックスほど好ましいものではないが、PAMまたはPAM250マトリックスも使用できる(たとえば、Schwartz and Dayhoff, eds.

, 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundationを参照のこと)。BLASTプログラムは、同定されたすべてのハイスコアセグメント対の統計的な有意性を評価し、好ましくはユーザー固有の相同率などのユーザーが独自に定める有意性の閾値レベルを満たすセグメントを選択する。統計的な有意性を求めるKarlinの式を用いてハイスコアセグメント対の統計的な有意性を評価すると好ましい(Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2267-2268参照のこと)。

[0042] (遺伝子、タンパク質分子、核酸分子などの改変)

あるタンパク質分子において、配列に含まれるあるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。

[0043] 上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている(Kyte, JおよびDoolittle, R. F. J. Mol. Biol. 157(1):105-132, 1982)。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子(例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など)との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは:イソロイシン(+4.5);バリン(+4.2);ロイシン(+3.8);フェニルアラニン(+2.8);システイン/シスチン(+2.5);メチオニン(+1.9);アラニン(+1.8);グリシン(-0.4);スレオニン(-0.7);セリン(-0.8);トリプトファン(-0.9);チロシン(-1.3);プロリン(-

1. 6);ヒスチジン(-3. 2);グルタミン酸(-3. 5);グルタミン(-3. 5);アスパラギン酸(-3. 5);アスパラギン(-3. 5);リジン(-3. 9);およびアルギニン(-4. 5))である。

[0044] あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質(例えば、酵素活性において等価なタンパク質)を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が ± 2 以内であることが好ましく、 ± 1 以内であることがより好ましく、および ± 0.5 以内であることがさらに好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。

[0045] 当該分野において、親水性指数もまた、改変設計において考慮され得る。米国特許第4, 554, 101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている:アルギニン(+3. 0);リジン(+3. 0);アスパラギン酸(+3. 0 \pm 1);グルタミン酸(+3. 0 \pm 1);セリン(+0. 3);アスパラギン(+0. 2);グルタミン(+0. 2);グリシン(0);スレオニン(-0. 4);プロリン(-0. 5 \pm 1);アラニン(-0. 5);ヒスチジン(-0. 5);システイン(-1. 0);メチオニン(-1. 3);バリン(-1. 5);ロイシン(-1. 8);イソロイシン(-1. 8);チロシン(-2. 3);フェニルアラニン(-2. 5);およびトリプトファン(-3. 4)。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が ± 2 以内であることが好ましく、 ± 1 以内であることがより好ましく、および ± 0.5 以内であることがさらに好ましい。

[0046] 本明細書において、「保存的置換」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数または／および疎水性指数が上記のように類似している置換をいう。保存的置換の例としては、例えば、親水性指数または疎水性指数が、 ± 2 以内のもの同士、好ましくは ± 1 以内のもの同士、より好ましくは ± 0.5 以内のもの同士のものが挙げられるがそれらに限定されない。従って、保存的置換の例は、当業者に周知であり、例えば、次の各グループ内での置換:アルギニンおよびリジン;グルタミン酸およびアスパラギン酸;セリンおよびスレオニン;グルタミンおよびアスパラギン;ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン、などが挙げられるがこれらに限定されない。

[0047] 本明細書において、「改変体」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮(truncated)改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。そのような改変体としては、基準となる核酸分子またはポリペプチドに対して、1または数個の置換、付加および／または欠失、あるいは1つ以上の置換、付加および／または欠失を含むものが挙げられるがそれらに限定されない。対立遺伝子(allele)とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。そのような対立遺伝子変異体は、通常その対応する対立遺伝子と同一または非常に類似性の高い配列を有し、通常はほぼ同一の生物学的活性を有するが、まれに異なる生物学的活性を有することもある。「種相同体またはホモログ(homolog)」とは、ある種の中で、ある遺伝子とアミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで、相同性(好ましくは、60%以上の相同性、より好ましくは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の相同性)を有するものをいう。そのような種相同体を取得する方法は、本明細書の記載から明らかである。「オルソログ(ortholog)」とは、オルソログ遺伝子(orthologous gene)ともいい、二つの遺伝子がある共通祖先からの種分化に由来する遺伝子をいう。例えば、多重遺伝子構造をもつヘモグロビン遺伝子ファミリーを例にとると、ヒトおよびマウスの α ヘモグロビン遺伝子はオルソログであるが、ヒトの α ヘモグロビン遺伝子および β ヘモグロビン遺伝子はパラログ(遺伝子重複で生じた遺伝子)である。オルソログは、分子系統樹の推定に有用である。オルソログは、通常別の種において、もとの種と同様の機能を果たしていることがあり得ることから、本発明のオルソログもまた、本発明において有用であり得る。

[0048] 本明細書において「保存的(に改変された)改変体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された改変体とは、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸をいい、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一な配列をいう。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一な核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG、およびGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。した

がって、アラニンがコドンにより特定される全ての位置で、そのコドンは、コードされたポリペプチドを変更することなく、記載された対応するコドンの任意のものに変更され得る。このような核酸の変動は、保存的に改変された変異の1つの種である「サイレント改変(変異)」である。ポリペプチドをコードする本明細書中のすべての核酸配列はまた、その核酸の可能なすべてのサイレント変異を記載する。当該分野において、核酸中の各コドン(通常メチオニンのための唯一のコドンであるAUG、および通常トリプトファンのための唯一のコドンであるTGGを除く)が、機能的に同一な分子を産生するために改変され得ることが理解される。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載された各配列において暗黙に含まれる。好ましくは、そのような改変は、ポリペプチドの高次構造に多大な影響を与えるアミノ酸であるシステインの置換を回避するようになされ得る。このような塩基配列の改変法としては、制限酵素などによる切断、DNAポリメラーゼ、Klenowフラグメント、DNAリガーゼなどによる処理等による連結等の処理、合成オリゴヌクレオチドなどを用いた部位特異的塩基置換法(特定部位指向突然変異法; Mark Zoller and Michael Smith, *Methods in Enzymology*, 100, 468-500(1983))が挙げられるが、この他にも通常分子生物学の分野で用いられる方法によって改変を行うこともできる。

- [0049] 本明細書中において、機能的に等価なポリペプチドを作製するために、アミノ酸の置換のほかに、アミノ酸の付加、欠失、または修飾もまた行うことができる。アミノ酸の置換とは、もとのペプチドを1つ以上、例えば、1-10個、好ましくは1-5個、より好ましくは1-3個のアミノ酸で置換することをいう。アミノ酸の付加とは、もとのペプチド鎖に1つ以上、例えば、1-10個、好ましくは1-5個、より好ましくは1-3個のアミノ酸を付加することをいう。アミノ酸の欠失とは、もとのペプチドから1つ以上、例えば、1-10個、好ましくは1-5個、より好ましくは1-3個のアミノ酸を欠失させることをいう。アミノ酸修飾は、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、短縮化、脂質化(lipidation)、ホスホリル化、アルキル化、グリコシル化、リン酸化、水酸化、アシル化(例えば、アセチル化)などを含むが、これらに限定されない。置換、または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってもよく、非天然のアミノ酸、またはアミノ酸アナログでもよい。天然のアミノ酸が好ましい。

- [0050] 本明細書において使用される用語「ペプチドアナログ」または「ペプチド誘導体」とは、ペプチドとは異なる化合物であるが、ペプチドと少なくとも1つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、ペプチドアナログには、もとのペプチドに対して、1つ以上のアミノ酸アナログまたはアミノ酸誘導体が付加または置換されているものが含まれる。ペプチドアナログは、その機能が、もとのペプチドの機能（例えば、pKa値が類似していること、官能基が類似していること、他の分子との結合様式が類似していること、水溶性が類似していることなど）と実質的に同様であるように、このような付加または置換がされている。そのようなペプチドアナログは、当該分野において周知の技術を用いて作製することができる。したがって、ペプチドアナログは、アミノ酸アナログを含むポリマーであり得る。
- [0051] 本発明のポリペプチドがポリマーに結合している、化学修飾されたポリペプチド組成物は、本発明の範囲に包含される。このポリマーは、水溶性であり得、水溶性環境（例えば、生理学的環境）でこのタンパク質の沈澱を防止し得る。適切な水性ポリマーは、例えば、以下からなる群より選択され得る：ポリエチレングリコール（PEG）、モノメキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、または他の炭水化物に基づくポリマー、ポリ（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）およびポリビニルアルコール。この選択されたポリマーは、通常は改変され、単一の反応性基（例えば、アシル化のための活性エステルまたはアルキル化のためのアルデヒド）を有し、その結果、重合度は制御され得る。ポリマーは、任意の分子量であり得、そして、このポリマーは分枝状でも分枝状でなくてもよく、そしてこのようなポリマーの混合物はまた、使用され得る。この化学修飾された本発明のポリマーは、治療用途に決定付けられる場合、薬学的に受容可能なポリマーが使用するために選択される。
- [0052] このポリマーがアシル化反応によって改変される場合、このポリマーは、単一の反応性エステル基を有するべきである。あるいは、このポリマーが還元アルキル化によって改変される場合、このポリマーは単一の反応性アルデヒド基を有するべきである。好ましい反応性アルデヒドは、ポリエチレングリコール、プロピオンアルデヒド（このブ

ロピオンアルデヒドは、水溶性である)または、そのモノC1〜C10の、アルコキシ誘導体もしくはアリアルオキシ誘導体である(例えば、米国特許第5, 252, 714号(これは、本明細書中で全体が参考として援用される)を参照のこと)。

[0053] 本発明のポリペプチドのペグ化(pegylation)は、例えば、以下の参考文献に記載されるような、当該分野で公知の、任意のペグ化反応によって実施され得る: Focus on Growth Factors 3, 4-10(1992); EP 0 154 316 ; および EP 0 401 384 (これらの各々は、本明細書中で、全体が参考として援用される)。好ましくは、このペグ化は、反応性ポリエチレングリコール分子(または、類似の反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施される。本発明のポリペプチドのペグ化のための好ましい水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール(PEG)である。本明細書中で使用される場合、「ポリエチレングリコール」は、PEGの任意の形態の包含することを意味し、ここで、このPEGは、他のタンパク質(例えば、モノ(C1〜C10)アルコキシポリエチレングリコールまたはモノ(C1〜C10)アリアルオキシポリエチレングリコール)を誘導体するために使用される。

[0054] 本発明のポリペプチドの化学誘導体化を、生物学的に活性な物質を活性化したポリマー分子と反応させるのに使用される適切な条件下で、実施され得る。ペグ化した本発明のポリペプチドを調製するための方法は、一般に以下の工程を包含する: (a) ポリペプチドが1以上のPEG基に結合するような条件下で、ポリエチレングリコール(例えば、PEGの、反応性エステルまたはアルデヒド誘導体)とこのポリペプチドを反応させる工程および(b) この反応生成物を得る工程。公知のパラメータおよび所望の結果に基づいて、最適な反応条件またはアシル化反応を選択することは当業者に容易である。

[0055] ペグ化された本発明のポリペプチドは、一般に、本明細書中に記載のポリペプチドを投与することによって、緩和または調節され得る状態を処置するために使用され得るが、しかし、本明細書中で開示された、化学誘導体化された本発明のポリペプチド分子は、それらの非誘導体分子と比較して、さらなる活性、増大された生物活性もしくは減少した生物活性、または他の特徴(例えば、増大された半減期または減少した半減期)を有し得る。本発明のポリペプチド、それらのフラグメント、改変体および誘

導体は、単独で、併用して、または他の薬学的組成物を組み合わせて使用され得る。これらのサイトカイン、増殖因子、抗原、抗炎症剤および／または化学療法剤は、徴候を処置するのに適切である。

[0056] 同様に、「ポリヌクレオチドアナログ」、「核酸アナログ」は、ポリヌクレオチドまたは核酸とは異なる化合物であるが、ポリヌクレオチドまたは核酸と少なくとも1つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、ポリヌクレオチドアナログまたは核酸アナログには、もとのペプチドに対して、1つ以上のヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体が付加または置換されているものが含まれる。

[0057] 本明細書において使用される核酸分子は、発現されるポリペプチドが天然型のポリペプチドと実質的に同一の活性を有する限り、上述のようにその核酸の配列の一部が欠失または他の塩基により置換されていてもよく、あるいは他の核酸配列が一部挿入されていてもよい。あるいは、5'末端および／または3'末端に他の核酸が結合していてもよい。また、ポリペプチドをコードする遺伝子をストリンジントな条件下でハイブリダイズし、そのポリペプチドと実質的に同一の機能を有するポリペプチドをコードする核酸分子でもよい。このような遺伝子は、当該分野において公知であり、本発明において利用することができる。

[0058] このような核酸は、周知のPCR法により得ることができ、化学的に合成することもできる。これらの方法に、例えば、部位特異的変位誘発法、ハイブリダイゼーション法などを組み合わせてもよい。

[0059] 本明細書において、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「置換、付加または欠失」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、それぞれアミノ酸もしくはその代替物、またはヌクレオチドもしくはその代替物が、置き換わること、付け加わることまたは取り除かれることをいう。このような置換、付加または欠失の技術は、当該分野において周知であり、そのような技術の例としては、部位特異的変異誘発技術などが挙げられる。置換、付加または欠失は、1つ以上であれば任意の数でよく、そのような数は、その置換、付加または欠失を有する改変体において目的とする機能（例えば、ホルモン、サイトカインの情報伝達機能など）が保持される限り、多くすることができる。例えば、そのような数は、1または数個であり得、そして好ましくは、全体の長さの20

%以内、10%以内、または100個以下、50個以下、25個以下などであり得る。

[0060] (遺伝子工学)

本発明において用いられる配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドならびにそのフラグメントおよび改変体は、遺伝子工学技術を用いて生産することができる。

[0061] 本発明において用いられ得る原核細胞に対する「組み換えベクター」としては、pcDNA3(+), pBluescript-SK(+/-), pGEM-T, pEF-BOS, pEGFP, pHAT, pUC18, pFT-DESTTM42GATEWAY (Invitrogen)などが例示される。

[0062] 本発明において用いられ得る動物細胞に対する「組み換えベクター」としては、pcDNA1/Amp, pcDNA1, pCDM8 (いずれもフナコシより市販)、pAGE107[特開平3-229 (Invitrogen)、pAGE103[J. Biochem. , 101, 1307(1987)]、pAMo, pAMoA[J. Biol. Chem. , 268, 22782-22787(1993)]、マウス幹細胞ウイルス(Murine Stem Cell Virus) (MSCV) に基づいたレトロウイルス型発現ベクター、pEF-BOS、pEGFPなどが例示される。

[0063] 哺乳動物細胞での発現のための強力なプロモーターとしては、例えば、種々の天然のプロモーター(例えば、SV40の初期プロモーター、アデノウイルスのE1Aプロモーター、ヒト サイトメガロウイルス(CMV)のプロモーター、ヒト延長因子-1 (EF-1)プロモーター、Drosophila 最小熱ショックタンパク質70 (HSP) のプロモーター、ヒト メタロチオネイン(MT)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、ヒト ユビキチンC (UBC)プロモーター、ヒト アクチンプロモーター)、および人工のプロモーター(例えば、SR α プロモーター(SV40初期プロモーターとHTLVのLTRプロモーターの融合)、CAGプロモーター(CMV-IEエンハンサーとニワトリ アクチンプロモーターのハイブリッド)のような融合プロモーター)が周知であることから、これら周知のプロモーターまたはその改変体を用いることによって、組換え発現の発現量を容易に上昇させることができる。

[0064] 大腸菌を宿主細胞として使用する場合、trpプロモーター(Ptrp)、lacプロモーター(Plac)、PLプロモーター、PRプロモーター、PSEプロモーター等の、大腸菌およびファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等を挙げることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター(P

trp x2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

[0065] 本明細書において「作動可能に連結された(る)」とは、所望の配列の発現(作動)がある転写翻訳調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサーなど)または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

[0066] 本明細書において、核酸分子を細胞に導入する技術は、どのような技術でもよく、例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクションなどが挙げられる。そのような核酸分子の導入技術は、当該分野において周知であり、かつ、慣用されるものであり、例えば、Ausubel F. A. ら編(1988)、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、New York、NY; Sambrook J ら(1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. およびその第三版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。遺伝子の導入は、ノーザンブロット、ウェスタンブロット分析のような本明細書に記載される方法または他の周知慣用技術を用いて確認することができる。

[0067] また、ベクターの導入方法としては、細胞にDNAを導入する上述のような方法であればいずれも用いることができ、例えば、トランスフェクション、形質導入、形質転換など(例えば、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法など)が挙げられる。

[0068] 本発明において遺伝子操作などにおいて原核生物細胞が使用される場合、原核生物細胞としては、Escherichia属、Serratia属、Bacillus属、Brevibacterium属、Corynebacterium属、Microbacterium属、Pseudomonas属などに属する原核生物細胞、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1が例示される。

[0069] 本明細書において使用される場合、動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞で

あるCHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637(特開昭63-299)、ヒト結腸癌細胞株などを挙げることができる。マウス・ミエローマ細胞としては、ps20、NSOなど、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0など、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293(ATCC:CRL-1573)など、ヒト白血病細胞としてはBALL-1など、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト結腸癌細胞株としてはHCT-15、ヒト神経芽細胞腫SK-N-SH、SK-N-SH-5Y、マウス神経芽細胞腫Neuro2Aなどが例示される。

- [0070] 本明細書において使用される場合、組換えベクターの導入方法としては、DNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法[Methods. Enzymol. , 194, 182(1990)]、リポフェクション法、スフェロプラスト法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929(1978)]、酢酸リチウム法[J. Bacteriol. , 153, 163(1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978)記載の方法などが例示される。
- [0071] 本明細書において、レトロウイルスの感染方法は、例えば、Current Protocols in Molecular Biology 前出(特にUnits 9. 9-9. 14)などに記載されるように、当該分野において周知であり、例えば、トリプシナイズして胚性幹細胞を単一細胞懸濁物(single-cell suspension)にした後、ウイルス産生細胞(virus-producing cells)(パッケージング細胞株=packaging cell lines)の培養上清と一緒に1-2時間共培養(co-culture)することにより、十分量の感染細胞を得ることができる。
- [0072] 本明細書において使用されるゲノムまたは遺伝子座などを除去する方法において用いられる、Cre酵素の一過的発現、染色体上でのDNAマッピングなどは、細胞工学別冊実験プロトコールシリーズ「FISH実験プロトコール ヒト・ゲノム解析から染色体・遺伝子診断まで」松原謙一、吉川 寛 監修 秀潤社(東京)などに記載されるように、当該分野において周知である。
- [0073] 本明細書において使用される場合、「キット」とは、複数の容器、および製造業者の指示書を含み、そして各々の容器が、本発明の薬学的組成物、その他の薬剤、およびキャリアを含む製品をいう。
- [0074] 本明細書において「薬学的に受容可能なキャリア」は、医薬または動物薬のような

農薬を製造するときに使用される物質であり、有効成分に有害な影響を与えないものをいう。そのような薬学的に受容可能なキャリアとしては、例えば、以下が挙げられるがそれらに限定されない：抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、賦形剤および／または薬学的アジュバント。

[0075] 本発明の処置方法において使用される薬剤の種類および量は、本発明の方法によって得られた情報（例えば、疾患に関する情報）を元に、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、投与される被検体の部位の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明のモニタリング方法を被検体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。疾患状態をモニタリングする頻度としては、例えば、毎日－数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回－1ヶ月に1回）のモニタリングが挙げられる。1週間－1ヶ月に1回のモニタリングを、経過を見ながら施すことが好ましい。

[0076] 必要に応じて、本発明の治療では、2種類以上の薬剤が使用され得る。2種類以上の薬剤を使用する場合、類似の性質または由来の物質を使用してもよく、異なる性質または由来の薬剤を使用してもよい。このような2種類以上の薬剤を投与する方法のための疾患レベルに関する情報も、本発明の方法によって入手することができる。

[0077] （好ましい実施形態の説明）

以下に好ましい実施形態の説明を記載するが、この実施形態は本発明の例示であり、本発明の範囲はそのような好ましい実施形態に限定されないことが理解されるべきである。当業者はまた、以下のような好ましい実施例を参考にして、本発明の範囲内にある改変、変更などを容易に行うことができることが理解されるべきである。

[0078] （ポリペプチドの製造方法）

本発明のポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞などに由来する形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、本発明の培養物より本発明のポリペプチド

を採取することにより、本発明に係るポリペプチドを製造することができる。

- [0079] 本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、本発明の生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。
- [0080] 炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類を用いることができる。
- [0081] 窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸または有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素物質、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。
- [0082] 無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。
- [0083] 培養温度は15〜40℃がよく、培養時間は、通常5時間〜7日間である。培養中pHは、3.0〜9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。また培養中必要に応じて、アンピシリンまたはテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。
- [0084] プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に

添加してもよい。遺伝子を導入した細胞または器官は、ジャーファーメンターを用いて大量培養することができる。

[0085] 例えば、動物細胞を用いる場合、本発明の細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI1640培地(The Journal of the American Medical Association, 199, 519(1967))、EagleのMEM培地(Science, 122, 501(1952))、DMEM培地(Virology, 8, 396(1959))、199培地(Proceedings of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950))またはこれら培地にウシ胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

[0086] 培養は、通常pH6〜8、25〜40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1〜7日間行う。また培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

[0087] 本発明のポリペプチドをコードする核酸配列で形質転換された形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離または精製するためには、当該分野で周知慣用の通常の酵素の単離または精製法を用いることができる。例えば、本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞外に本発明のポリペプチドが分泌される場合には、その培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。その可溶性画分から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈澱法、ジエチルアミノエチル(DEAE)−Sephacel、DIAION HPA−75(三菱化成)等樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S−Sephacel FF(Pharmacia)等の樹脂を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等の樹脂を用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

[0088] 本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、その細胞を洗浄した後に、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモジナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。その無細胞抽

出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈澱法、ジエチルアミノエチル(DEAE)–Sephrose、DI AION HPA–75(三菱化成)等樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S–Sephrose FF(Pharmacia)等の樹脂を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等の樹脂を用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用いることによって、精製標品を得ることができる。

[0089] 本発明のポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈澱画分より、通常の方法により本発明のポリペプチドを回収後、そのポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。この可溶化液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、本発明のポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

[0090] また、通常のタンパク質の精製方法[J. Evan. Sadlerら:Methods in Enzymology, 83, 458]に準じて精製できる。また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる[山川彰夫, 実験医学(Experimental Medicine), 13, 469–474(1995)]。例えば、Loweらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. , USA, 86, 8227–8231(1989)、Gene sDevelop. , 4, 1288(1990)]に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

[0091] また、本発明のポリペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗FLAG抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる[Proc. Natl. Acad. Sci. , USA, 86, 8227(1989)、Genes Develop. , 4, 1288(1990)]。このような融合タンパク質では、発現ベクターにおいて、タンパク質分解切

断部位は、融合タンパク質の精製に続いて、融合部分からの組換えタンパク質の分離を可能にするために、融合部分と組換えタンパク質との接合部に導入される。このような酵素およびこれらの同族の認識配列は、第Xa因子、トロンビン、およびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、それぞれ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを標的組換えタンパク質に融合する、pGEX (Pharmacia Biotech; SmithおよびJohnson (1988) Gene 67, 31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) および pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N. J.) が挙げられる。

[0092] さらに、本発明のポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。本発明のポリペプチドは、公知の方法 [J. Biomolecular NMR, 6, 129-134, Science, 242, 1162-1164, J. Biochem. , 110, 166-168 (1991)] に準じて、in vitro 転写・翻訳系を用いて生産することができる。

[0093] 本発明のポリペプチドは、そのアミノ酸情報を基に、Fmoc法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法 (t-ブチルオキシカルボニル法) 等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech、Applied Biosystems、Pharmacia Biotech、Protein Technology Instrument、Synthecell-Vega、PerSeptive、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

[0094] 精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、タンパク質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析 (平野久著、東京化学同人発行、1993年) に記載の方法により実施可能である。本発明のポリペプチドの生理活性は、公知の測定法に準じて測定することができる。

[0095] 本発明において有用な可溶性ポリペプチドの産生もまた、当該分野で公知の種々の方法によって達成され得る。例えば、ポリペプチドは、エキソペプチダーゼ、エンドマン分解またはその両方と組み合わせて特定のエンドペプチダーゼを使用することによるタンパク質分解によって、インタクトなポリペプチド分子から誘導され得る。このインタクトなポリペプチド分子は、従来の方法を使用して、その天然の供給源から精製され得る。あるいは、インタクトなポリペプチドは、cDNA、発現ベクターおよび組換え

遺伝子発現のための周知技術を利用する組換えDNA技術によって生成され得る。

- [0096] 好ましくは、本発明において有用な可溶性ポリペプチドは、直接的に産生され、従って、出発材料としてのポリペプチド全体の必要性を排除する。これは、従来の化学合成技術によって達成され得るか、または周知の組換えDNA技術(ここで、所望のペプチドをコードするDNA配列のみが形質転換された宿主で発現される)によって達成され得る。例えば、所望の可溶性ポリペプチドをコードする遺伝子は、オリゴヌクレオチド合成機を使用する化学的手段によって合成され得る。このようなオリゴヌクレオチドは、所望の可溶性ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて設計される。所望のペプチドをコードする特定のDNA配列はまた、特定の制限エンドヌクレアーゼフラグメントの単離によってか、またはcDNAからの特定の領域のPCR合成によって、全長DNA配列から誘導され得る。

- [0097] (変異型ポリペプチドの作製方法)

本発明のポリペプチドのアミノ酸の欠失、置換もしくは付加(融合を含む)は、周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができる。かかる1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1〜38, John Wiley & Sons(1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487(1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315(1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431(1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488(1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5662(1984)、Science, 224, 1431(1984)、PCT WO85/00817(1985)、Nature, 316, 601(1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

- [0098] (合成化学)

本明細書におけるペプチド、化学物質、低分子などの因子は、合成化学技術を用いて合成することができる。そのような合成化学技術は、当該分野において周知の技術を用いることができる。そのような周知技術としては、例えば、Fiesers' Reagents for Organic Synthesis (Fieser's Reagents for Organic Synthesis) Tse-Lok Ho, John Wiley

& Sons Inc (2002)などを参照することができる。

[0099] 本発明の因子が化合物として利用される場合、塩形態で用いることができる。「塩」としては、製薬上許容される塩が好ましく、例えば無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機塩基との塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩としては、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩としては、塩酸、フッ化水素酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸、過塩素酸、ヨウ化水素酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩としては、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、マンデル酸、アスコルビン酸、乳酸、グルコン酸、メタンサルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩としては、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

[0100] 本発明の因子が化合物として利用される場合、水和物形態で用いることができる。「水和物」としては、薬理学的に許容される水和物が好ましく、また、含水塩も含まれ。具体的には、一水和物、二水和物、六水和物等が挙げられる。

[0101] (免疫化学)

本発明のポリペプチドを認識する抗体の作製もまた当該分野において周知である。例えば、ポリクローナル抗体の作製は、取得したポリペプチドの全長または部分断片精製標品、あるいは本発明のタンパク質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することにより行うことができる。

[0102] 抗体を生産する場合、投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。その抗原の投与量は動物1匹当たり50〜100 μ gが好ましい。ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン(keyhole limpet haemocyanin)またはウシチログロブリン等のキャリアタンパク質に共有結合させ

たものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。その抗原の投与は、1回目の投与の後1〜2週間おきに3〜10回行う。各投与後、3〜7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法[酵素免疫測定法(ELISA法):医学書院刊 1976年、Antibodies—A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)]等で確認する。

- [0103] 免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、その血清より、周知技術を用いてポリクローナル抗体を分離、精製することができる。モノクローナル抗体の作製もまた当該分野において周知である。抗体産性細胞の調製のために、まず、免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として使用し、骨髓腫細胞との融合により、ハイブリドーマの作製を行う。その後、酵素免疫測定法になどより、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。このようにして得たハイブリドーマから産生されたモノクローナル抗体は種々の目的に使用することができる。
- [0104] このような抗体は、例えば、本発明のポリペプチドの免疫学的検出方法に使用することができ、本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの免疫学的検出法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法等を挙げることができる。
- [0105] また、本発明ポリペプチドの免疫学的定量方法にも使用することができる。本発明ポリペプチドの定量方法としては、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、¹²⁵I等の放射性同位体で標識した本発明のタンパク質と本発明のタンパク質を認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等を挙げることができる。
- [0106] 本発明のポリペプチドのmRNAの定量方法もまた、当該分野において周知である。例えば、本発明のポリヌクレオチドあるいはDNAより調製した上記オリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法により、本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現量をmRNAレベルで定量することができる。このような

技術は、当該分野において周知であり、本明細書において列挙した文献にも記載されている。

- [0107] 当該分野で公知の任意の方法によって、これらのポリヌクレオチドが得られ得、そしてこれらポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、決定され得る。例えば、抗体のヌクレオチド配列が公知である場合、この抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドからアセンブルされ得(例えば、Kutmeierら、BioTechniques 17:242(1994)に記載されるように)、これは、手短に言えば、抗体をコードする配列の部分を含むオーバーラップするヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよび連結、ならびに次いでPCRによるこの連結されたオリゴヌクレオチドの増幅を含む。
- [0108] 抗体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供給源由来の核酸から作製することができる。ある抗体をコードする核酸を含むクローンは入手不可能だが、その抗体分子の配列が既知である場合、免疫グロブリンをコードする核酸は、化学的に合成され得るか、あるいは適切な供給源(例えば、抗体cDNAライブラリーまたは抗体を発現する任意の組織もしくは細胞(例えば、本発明の抗体の発現のために選択されたハイブリドーマ細胞)から生成されたcDNAライブラリー、またはそれから単離された核酸(好ましくはポリA+RNA))から、例えば、抗体をコードするcDNAライブラリーからのcDNAクローンを同定するために、その配列の3'末端および5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するPCR増幅によって、またはその特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって得ることができる。PCRによって作製された増幅された核酸は、当該分野で周知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクターにクローニングされ得る。
- [0109] 一旦、抗体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、抗体のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作について当該分野で周知の方法(例えば、組換えDNA技術、部位指向性変異誘発、PCRなど(例えば、Sambrookら、1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYおよびAusubelら編、1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYに記載の

技術を参照のこと。これらは両方がその全体において本明細書に参考として援用される。))を用いて操作され、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および／または挿入を生成するように異なるアミノ酸配列を有する抗体を作製し得る。

[0110] 特定の実施形態において、重鎖可変ドメインおよび／または軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、相補性決定領域(CDR)の配列の同定のために、当該分野において周知の方法によって(例えば、配列超可変性の領域を決定するために、他の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の既知のアミノ酸配列と比較することによって)調べられ得る。慣用的な組換えDNA技術を用いて、1つ以上のCDRが、前述のようにフレームワーク領域内に(例えば、非ヒト抗体をヒト化するために、ヒトフレームワーク領域中に)挿入され得る。このフレームワーク領域は天然に存在し得るか、またはコンセンサスフレームワーク領域であり得、そして好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る(例えば、列挙したヒトフレームワーク領域については、Chothiaら、J. Mol. Biol. 278: 457-479(1998)を参照のこと)。好ましくは、フレームワーク領域およびCDRの組み合わせによって生成されたポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上記に議論されるように、1つ以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域内で作製され得、そして好ましくは、そのアミノ酸置換は、抗体のその抗原への結合を改善する。さらに、このような方法は、1つ以上の鎖内ジスルフィド結合が欠如した抗体分子を生成するように、鎖内ジスルフィド結合に関与する1つ以上の可変領域のシステイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製するために使用され得る。ポリヌクレオチドへの他の変更は、本発明によって、および当該分野の技術において包含される。

[0111] さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングさせることによって、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術(Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855(1984); Neubergerら、Nature 312:604-608(1984); Takedaら、Nature 314:452-454(1985))が使用され得る。上記のように、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、このような分子は、マウスmAbおよびヒト免疫グロブリンの定常領域由来の可変領域を有する(例えば、ヒト化抗体)。

[0112] 単鎖抗体を製造する場合、単鎖抗体の産生に関する記載された公知の技術(米国特許第4, 946, 778号; Bird、Science 242:423-42(1988); Hustonら、Proc . Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883(1988); および Wardら、Nature 334:544-54(1989))が、利用され得る。単鎖抗体は、Fv領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じる。E. coliにおける機能性Fvフラグメントのアセンブリのための技術もまた、使用され得る(Skerraら、Science 242:1038-1041(1988))。

[0113] (抗体を産生する方法)

本発明の抗体は、抗体の合成のために当該分野で公知の任意の方法によって、化学合成によって、または、好ましくは、組換え発現技術によって産生され得る。

[0114] 本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログ(例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖または本発明の単鎖抗体)の組換え発現は、その抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。一旦、本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、あるいはそれらの部分(好ましくは、重鎖または軽鎖の可変ドメインを含有する)をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の産生のためのベクターは、当該分野で周知の技術を用いる組換えDNA技術によって生成され得る。従って、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドの発現によってタンパク質を調製するための方法は、本明細書に記載される。当業者に周知の方法は、抗体をコードする配列ならびに適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターの構築のために使用され得る。これらの方法としては、例えば、インビトロの組換えDNA技術、合成技術、およびインビボの遺伝子組換えが挙げられる。従って、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体分子、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む、複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域(例えば、PCT公開 WO86/05807; PCT公開 WO89/01036; および米国特許第5, 122, 464号を参照のこと)をコードするヌクレオチド配列を含み得、そしてこの抗体の可変ドメインは、重鎖または軽鎖の全体の発現のためにこのようなベクターにクローニングされ得る。

- [0115] この発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞へと移入され、次いで、このトランスフェクトされた細胞は、本発明の抗体を産生するために、従来技術によって培養される。従って、本発明は、異種プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または本発明の単鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二重鎖抗体の発現についての好ましい実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、以下に詳述されるように、免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞中に同時発現され得る。
- [0116] 本発明の関連した局面において、薬学的組成物（例えば、ワクチン組成物）が、予防適用または治療適用のために提供される。このような組成物は、一般に、本発明の免疫原性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドおよび免疫刺激剤（例えば、アジュバント）を含む。
- [0117] 本発明の抗体（例えば、モノクローナル抗体）は、標準的な技術（例えば、親和性クロマトグラフィーまたは免疫沈降）によって、本発明のポリペプチドなどを単離するために用いられ得る。ある因子に特異的な抗体は、細胞からの天然の因子、そして宿主細胞において発現される組換え的に産生された因子の精製を容易にし得る。さらに、そのような抗体が、（例えば、細胞の溶解液または細胞上清における）本発明のタンパク質を検出するために用いられ、本発明のタンパク質の発現の存在の量およびパターンを評価し得る。このような抗体は、例えば、所定の処置レジメンの有効性を決定するために、臨床試験の手順の一部として組織におけるタンパク質レベルを診断的にモニターするために用いられ得る。検出は、抗体を検出可能物質に連結する（すなわち、物理的に連結する）ことにより容易になり得る。検出可能物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられる；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン（dichlorotriazinylamine）フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが

挙げられる；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられる；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ；そして、適切な放射性物質の例としては ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が挙げられるがそれらに限定されない。

[0118] 本発明の別の局面は、哺乳動物において、免疫応答を誘導するに十分な量のポリペプチドをこの哺乳動物に投与することにより本発明のポリペプチドに対する免疫応答を誘導する方法に関する。この量は、動物種、動物の大きさなどに依存するが、当業者により決定され得る。

[0119] (スクリーニング)

本明細書において「スクリーニング」とは、目的とするある特定の性質をもつ生物または物質などの標的を、特定の操作／評価方法で多数を含む集団の中から選抜することをいう。スクリーニングのために、本発明の因子(例えば、抗体)、ポリペプチドまたは核酸分子を使用することができる。スクリーニングは、インビトロ、インビボなど実在物質を用いた系を使用してもよく、インシリコ(コンピュータを用いた系)の系を用いて生成されたライブラリーを用いてもよい。本発明では、所望の活性を有するスクリーニングによって得られた化合物もまた、本発明の範囲内に包含されることが理解される。また本発明では、本発明の開示をもとに、コンピュータモデリングによる薬物が提供されることも企図される。

[0120] 1実施形態において、本発明は、本発明のタンパク質または本発明のポリペプチド、あるいはその生物学的に活性な部分に結合するか、またはこれらの活性を調節する、候補化合物もしくは試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数のアプローチの任意のものを使用して得られ、これには、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間的にアクセス可能な平行固相もしくは溶液相ライブラリー；逆重畳を要する合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーもしくは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である(Lam(1997) Anticancer Drug Des. 12:145)。

- [0121] 分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば以下に見出され得る：DeWittら(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6909;Erbら(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422;Zuckermannら(1994)J. Med. Chem 37:2678;Choら(1993)Science 261:1303;Carrellら(1994)Angew Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059;Carellら(1994)Angew Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061;およびGallopら(1994)J. Med. Chem 37:1233。
- [0122] 化合物のライブラリーは、溶液中で(例えば、Houghten(1992)BioTechniques 13:412〜421)、あるいはビーズ上(Lam(1991)Nature 354:82〜84)、チップ上(Fodor(1993)Nature 364:555〜556)、細菌(Ladner 米国特許第5, 223, 409号)、胞子(Ladner、上記)、プラスミド(Cullら(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865〜1869)またはファージ上(ScottおよびSmith(1990)Science 249:386〜390;Devlin(1990)Science 249:404〜406;Cwirlaら(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:6378〜6382;Felici(1991)J Mol Biol 222:301〜310;Ladner上記)において示され得る。
- [0123] (薬学的組成物)
- 本発明のポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含む発現ベクターおよび遺伝子導入ベクター、アンチセンス核酸、ポリペプチド、ならびにポリペプチドに対する抗体は、血管内皮細胞増殖促進のため、c-fosプロモーターからの転写促進のため、VEGFプロモーターからの転写促進のため、および血管新生促進のため、ならびに、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、末梢血管病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患の処置、予防、診断または予後のための薬学的組成物の成分としても使用することが可能である。
- [0124] 本明細書において薬剤の「有効量」とは、その薬剤が目的とする薬効が発揮することができる量をいう。本明細書において、そのような有効量のうち、最小の濃度を最小有効量ということがある。そのような最小有効量は、当該分野において周知であり、通常、薬剤の最小有効量は当業者によって決定されているか、または当業者は適宜決定することができる。そのような有効量の決定には、実際の投与のほか、動物モデルなどを用いることも可能である。本発明はまた、このような有効量を決定する際に有用

である。

- [0125] 本明細書において「薬学的に受容可能なキャリア」は、医薬または動物薬のような農薬を製造するときに使用される物質であり、有効成分に有害な影響を与えないものをいう。そのような薬学的に受容可能なキャリアとしては、例えば、以下が挙げられるがそれらに限定されない：抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、賦形剤および／または農学的もしくは薬学的アジュバント。
- [0126] 本発明の処置方法において使用される薬剤の種類および量は、本発明の方法によって得られた情報（例えば、疾患に関する情報）を元に、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、投与される被検体の部位の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明のモニタリング方法を被検体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。疾患状態をモニタリングする頻度としては、例えば、毎日－数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回－1ヶ月に1回）のモニタリングが挙げられる。1週間－1ヶ月に1回のモニタリングを、経過を見ながら施すことが好ましい。
- [0127] 必要に応じて、本発明の治療では、2種類以上の薬剤が使用され得る。2種類以上の薬剤を使用する場合、類似の性質または由来の物質を使用してもよく、異なる性質または由来の薬剤を使用してもよい。このような2種類以上の薬剤を投与する方法のための疾患レベルに関する情報も、本発明の方法によって入手することができる。
- [0128] 本発明では、いったん類似の種類（例えば、ヒトに対するマウスなど）の生物、培養細胞、組織などに関し、ある特定の糖鎖構造の分析結果と、疾患レベルとが相関付けられた場合、対応する糖鎖構造の分析結果と、疾患レベルとが相関付けることができることは、当業者は容易に理解する。そのような事項は、例えば、動物培養細胞マニュアル、瀬野ら編著、共立出版、1993年などに記載され支持されており、本明細書においてこのすべての記載を援用する。
- [0129] （遺伝子治療）

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspielら, *Clinical Pharmacology* 12:488–505(1993); WuおよびWu, *Biotherapy* 3:87–95(1991); Tolshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573–596(1993); Mulligan, *Science* 260:926–932(1993); ならびにMorganおよびAnderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191–217(1993); May, *TIBTECH* 11(5):155–215(1993)を参照のこと。遺伝子治療において使用される一般的に公知の組換えDNA技術は、Ausubelら(編), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY(1993); およびKriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY(1990)に記載される。

- [0130] 遺伝子治療に使用される核酸構築物は、周知の遺伝子導入ベクターを用いて局所的にまたは全身的にのいずれかで投与され得る。そのような核酸構築物がタンパク質のコード配列を包含する場合、そのタンパク質の発現は、内因性の哺乳類のプロモーターまたは異種のプロモーターの使用により誘導され得る。コード配列の発現は、構成的であり得るか、または調節され得る。
- [0131] 種々の周知の遺伝子導入ベクターを遺伝子治療のための組成物として使用する場合、ベクターの投与は、PBS(リン酸緩衝化生理食塩水)または生理食塩水などに懸濁したベクター懸濁液の局所(例えば、癌組織内、肝臓内、筋肉内および脳内など)への直接注入か、または血管内(例えば、動脈内、静脈内および門脈内)への投与によりなされる。
- [0132] 1つの実施態様において、遺伝子導入ベクターは、一般には、この遺伝子導入ベクターを単位用量注入可能な形態(溶液、懸濁液または乳濁液)で、薬学的に受容可能なキャリア(すなわち、使用された投薬量および濃度においてレシipientに対して非毒性であり、そして処方物の他の成分と適合性であるもの)とを混合することによって処方され得る。例えば、処方物は、好ましくは、酸化剤および遺伝子導入ベクターにとって有害であることが公知である他の化合物を含まない。
- [0133] キャリアは、等張性および化学的安定性を増強する物質のような微量の添加物を適宜含む。このような物質は、使用された投薬量および濃度においてレシipientに対して非毒性であり、そしてリン酸、クエン酸、コハク酸、酢酸、および他の有機酸また

はそれらの塩のような緩衝剤;アスコルビン酸のような抗酸化剤;低分子量(約10残基未満の)ポリペプチド(例えば、ポリアルギニンまたはトリペプチド);タンパク質(例えば、血清アルブミン、ゼラチン、またはイムノグロブリン);親水性ポリマー(例えば、ポリビニルピロリドン);アミノ酸(例えば、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、またはアルギニン);単糖、二糖および他の炭水化物(セルロースまたはその誘導体、グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む);キレート剤(例えば、EDTA);糖アルコール(例えば、マンニトールまたはソルビトール);対イオン(例えば、ナトリウム);および/または非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート、ポロキサマー)、またはPEGを含み得る。

[0134] 遺伝子導入ベクターを含む薬学的組成物は、代表的には、単位または多用量容器、例えば、密封アンプルまたはバイアルにおいて、水溶液として貯蔵され得る。

[0135] 遺伝子導入ベクターを含む薬学的組成物は医療実施基準(good medical practice)に一致した様式で、個々の患者の臨床状態(例えば、予防または処置されるべき状態)、遺伝子導入ベクターを含む組成物の送達部位、標的組織、投与方法、投与計画および当業者に公知の他の因子を考慮しつつ処方され、そして投与される。

[0136] 例えば、ヒトにHJV(センダイウイルス)エンベロープベクターを投与する場合、マウス一匹あたり、20〜20,000HAU相当の、好ましくは60〜6,000HAU相当の、より好ましくは200〜2,000HAU相当のエンベロープベクターが投与される。投与されるエンベロープベクター中に含有される外来遺伝子の量は、マウス一匹あたり、0.1〜100 μ g、好ましくは0.3〜30 μ g、より好ましくは1〜10 μ gである。

[0137] また、ヒトにHJV(センダイウイルス)エンベロープベクターを投与する場合、被験体あたり、400〜400,000HAU相当の、好ましくは1,200〜120,000HAU相当の、より好ましくは4,000〜40,000HAU相当のエンベロープベクターが投与される。投与されるエンベロープベクター中に含有される外来遺伝子の量は、被験体あたり、2〜2,000 μ g、好ましくは6〜600 μ g、より好ましくは20〜200 μ gである。

[0138] 本発明のポリペプチドを、上記の遺伝子治療において用いる方法と同様にして、遺伝子導入ベクター中に入れ、そしてそのポリペプチドを所望の部位に送達することも可能である。

- [0139] 本発明のポリペプチドやポリヌクレオチドを疾病の治療に用いる場合には、例えば、骨格筋や心筋に直接注入する方法、ベクターに封入して導入する方法が考えられる。ベクターとしてはポリヌクレオチドの場合は、ウイルスベクター（アデノウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターなど）や非ウイルスベクター（リポソーム、HVJ-Eなど）により直接注入や血管内投与によるターゲティングなどが可能である。またポリペプチドの場合は、HVJ-Eが好ましく、直接投与が効果的であると考えられる。またゼラチンハイドロゲルやアテロコラーゲン、ポリ乳酸に封入して虚血部位の近く（筋肉中、脳内、皮下など）に埋め込み徐放化させる方法もある。
- [0140] このような方法によって血管内皮細胞の増殖や遊走がおこり、管腔形成により血管が新生される。さらに血管平滑筋細胞の遊走により血管の補強が行われ、機能的な血管となって末梢にまで血液の供給が可能になる。これによって血管閉塞部位を周囲に側副血行路が生じ虚血部位への循環血液量が増強されるために、末梢血管病、虚血性心、脳疾患の治療が可能になる。
- [0141] VEGFを用いた遺伝子治療に関して、Isner, J., ら、Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. The Lancet 348, 370-374, (1996); Baumgartner, I., ら、Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with clinical limb ischemia. Circulation, 97, 1114-1123, (1998); および Machens, H-G., ら、Angiogenic effects of injected VEGF165 and sVEGFR-1 in a rat flap model. J. Surgical Research 111, 136-142, (2003) が報告されている。
- [0142] 血管新生ペプチドとしては、Li, J., et al.: pR39, a peptide regulator of angiogenesis. Nature Medicine 6, 49-55, (2000)、および Koczulla, R., et al.: An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. J. Clin. Invest. 111, 1665-1672, (2003) が報告されている。
- [0143] 動物モデルとしては、couffinhal, T., et al.: Mouse model of angiogenesis. Am. J. Pathol. 152, 1667-1679, (1998) が報告されている。

[0144] また、マウスやラット或いはラビットの大腿動脈の1つを結紮して除去し、これにより虚血部位を作成し、遺伝子や蛋白の筋肉内投与による治療効果を組織染色による血管数、レーザードップラーによる血流量、血管造影などにより判定することによって、血管新生を検出することも可能である。

[0145] (本明細書において用いられる一般的技術)

本明細書において使用される技術は、そうではないと具体的に指示しない限り、当該分野の技術範囲内にある、糖鎖科学、マイクロフレイディクス、微細加工、有機化学、生化学、遺伝子工学、分子生物学、微生物学、遺伝学および関連する分野における周知慣用技術を使用する。そのような技術は、例えば、以下に列挙した文献および本明細書において他の場所において引用した文献においても十分に説明されている。

[0146] 微細加工については、例えば、Campbell, S. A. (1996). The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication, Oxford University Press; Zaut, P. V. (1996). Micromicroarray Fabrication: a Practical Guide to Semiconductor Processing, Semiconductor Services; Madou, M. J. (1997). Fundamentals of Microfabrication, CRC Press; Rai-Choudhury, P. (1997). Handbook of Microlithography, Micromachining, & Microfabrication: Microlithographyなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

[0147] 本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法、糖鎖科学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Maniatis, T. et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M., et al. eds, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., NY, 10158 (2000); Innis, M. A. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press; Innis, M. A. et al. (1995). PCR Strategies, Academic Press; Sninsky, J. J. et al. (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press

;Gait, M. J. (1985). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Gait, M. J. (1990). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Press; Method in Enzymology 230, 242, 247, Academic Press, 1994; 別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分(全部であり得る)が参考として援用される。

[0148] (処方)

本発明はまた、有効量の治療剤の被験体への投与による、疾患または障害(例えば、感染症)の処置および／または予防の方法を提供する。治療剤は、薬学的に受容可能なキャリア型(例えば、滅菌キャリア)と組み合わせた、本発明の組成物を意味する。

[0149] 治療剤を、個々の患者の臨床状態(特に、治療剤単独処置の副作用)、送達部位、投与方法、投与計画および当業者に公知の他の因子を考慮に入れ、医療実施基準(GMP=good medical practice)を遵守する方式で処方および投薬する。従って、本明細書において目的とする「有効量」は、このような考慮を行って決定される。

[0150] 一般的提案として、用量当り、非経口的に投与される治療剤の合計薬学的有効量は、患者体重の、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ ～ $10\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ の範囲にあるが、上記のようにこれは治療的裁量に委ねられる。さらに好ましくは、本発明の細胞生理活性物質について、この用量は、少なくとも $0.01\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 、最も好ましくはヒトに対して約 $0.01\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ と約 $1\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ との間である。連続投与する場合、代表的には、治療剤を約 $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時間}$ ～約 $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時間}$ の投薬速度で1日に1～4回の

注射かまたは連続皮下注入(例えばミニポンプを用いる)のいずれかにより投与する。静脈内用バッグ溶液もまた使用し得る。変化を観察するために必要な処置期間および応答が生じる処置後の間隔は、所望の効果に応じて変化するのである。

- [0151] 治療剤を、経口的、直腸内、非経口的、槽内(intracistemally)、腔内、腹腔内、局所的(粉剤、軟膏、ゲル、点滴剤、または経皮パッチによるなど)、口内あるいは経口または鼻腔スプレーとして投与し得る。「薬学的に受容可能なキャリア」とは、非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、被包材または任意の型の処方補助剤をいう。本明細書で用いる用語「非経口的」とは、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節内の注射および注入を含む投与の様式をいう。
- [0152] 本発明の治療剤はまた、徐放性システムにより適切に投与される。徐放性治療剤の適切な例は、経口的、直腸内、非経口的、槽内(intracistemally)、腔内、腹腔内、局所的(粉剤、軟膏、ゲル、点滴剤、または経皮パッチによるなど)、口内あるいは経口または鼻腔スプレーとして投与され得る。「薬学的に受容可能なキャリア」とは、非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、被包材または任意の型の処方補助剤をいう。本明細書で用いる用語「非経口的」とは、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節内の注射および注入を含む投与の様式をいう。
- [0153] 本発明の治療剤はまた、徐放性システムにより適切に投与される。徐放性治療剤の適切な例は、適切なポリマー物質(例えば、成形品(例えば、フィルムまたはマイクロカプセル)の形態の半透過性ポリマーマトリックス)、適切な疎水性物質(例えば、許容品質油中のエマルジョンとして)またはイオン交換樹脂、および貧可溶性誘導体(例えば、貧可溶性塩)を包含する。
- [0154] 徐放性マトリックスとしては、ポリラクチド(米国特許第3, 773, 919号、EP58, 481)、L-グルタミン酸およびγ-エチル-L-グルタメートのコポリマー(Sidmanら、Biopolymers 22:547-556(1983))、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(Langerら、J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277(1981)、およびLanger, Chem. Tech. 12:98-105(1982))、エチレンビニルアセテート(Langerら、同書)またはポリ-D-(+)-3-ヒドロキシ酪酸(EP133, 988)が挙げられる。
- [0155] 徐放性治療剤はまた、リポソームに包括された本発明の治療剤を包含する(一般に

、Langer, Science 249:1527–1533(1990); Treatら, Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez–Berestein and Fidler(編), Liss, New York, 317–327頁および353–365(1989)を参照のこと)。治療剤を含有するリポソームは、それ自体が公知である方法により調製され得る: DE3, 218, 121; Epsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688–3692(1985); Hwangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030–4034(1980); EP52, 322; EP36, 676; EP88, 046; EP143, 949; EP142, 641; 日本国特許出願第83–118008号; 米国特許第4, 485, 045号および同第4, 544, 545号ならびにEP第102, 324号。通常、リポソームは、小さな(約200–800 Å)ユニラメラ型であり、そこでは、脂質含有量は、約30モル%コレステロールよりも多く、選択された割合が、最適治療剤のために調整される。

[0156] なおさらなる実施態様において、本発明の治療剤は、ポンプにより送達される(Langer, 前出; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201(1987); Buchwaldら, Surgery 88:507(1980); Saudekら, N. Engl. J. Med. 321:574(1989)を参照のこと)。

[0157] 他の制御放出系は、Langer(Science 249:1527–1533(1990))による総説において議論される。

[0158] 非経口投与のために、1つの実施態様において、一般に、治療剤は、それを所望の程度の純度で、薬学的に受容可能なキャリア、すなわち用いる投薬量および濃度でレシipientに対して毒性がなく、かつ処方物の他の成分と適合するものと、単位投薬量の注射可能な形態(溶液、懸濁液または乳濁液)で混合することにより処方される。例えば、この処方物は、好ましくは、酸化、および治療剤に対して有害であることが知られている他の化合物を含まない。

[0159] 一般に、治療剤を液体キャリアまたは微細分割固体キャリアあるいはその両方と均一および緊密に接触させて処方物を調製する。次に、必要であれば、生成物を所望の処方物に成形する。好ましくは、キャリアは、非経口的キャリア、より好ましくはレシipientの血液と等張である溶液である。このようなキャリアビヒクルの例としては、水、生理食塩水、リンゲル溶液およびデキストロース溶液が挙げられる。不揮発性油およ

びオレイン酸エチルのような非水性ビヒクルもまた、リポソームと同様に本明細書において有用である。

- [0160] キャリアは、等張性および化学安定性を高める物質のような微量の添加剤を適切に含有する。このような物質は、用いる投薬量および濃度でレシピエントに対して毒性がなく、このような物質としては、リン酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、酢酸および他の有機酸またはその塩類のような緩衝剤；アスコルビン酸のような抗酸化剤；低分子量（約10残基より少ない）ポリペプチド（例えば、ポリアルギニンまたはトリペプチド）；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸またはアルギニンのようなアミノ酸；セルロースまたはその誘導体、ブドウ糖、マンノースまたはデキストリンを含む、単糖類、二糖類、および他の炭水化物；EDTAのようなキレート剤；マンニトールまたはソルビトールのような糖アルコール；ナトリウムのような対イオン；および／またはポリソルベート、ポロキサマーもしくはPEGのような非イオン性界面活性剤が挙げられる。
- [0161] 治療剤は、代表的には約0.1mg/ml〜100mg/ml、好ましくは1〜10mg/mlの濃度で、約3〜8のpHで、このようなビヒクル中に処方される。前記の特定の賦形剤、キャリアまたは安定化剤を使用することにより、塩が形成されることが理解される。
- [0162] 治療的投与に用いられるべき任意の薬剤は、有効成分としてのウイルス以外の生物・ウイルスを含まない状態、すなわち、無菌状態であり得る。滅菌濾過膜（例えば0.2ミクロンメンブラン）で濾過することにより無菌状態は容易に達成される。一般に、治療剤は、滅菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下用注射針で穿刺可能なストッパー付の静脈内用溶液バッグまたはバイアルに配置される。
- [0163] 治療剤は、通常、単位用量または複数用量容器、例えば、密封アンプルまたはバイアルに、水溶液または再構成するための凍結乾燥処方物として貯蔵される。凍結乾燥処方物の例として、10mlのバイアルに、滅菌濾過した1% (w/v) 治療剤水溶液5mlを充填し、そして得られる混合物を凍結乾燥する。凍結乾燥した治療剤を、注射用静菌水を用いて再構成して注入溶液を調製する。
- [0164] 本発明はまた、本発明の治療剤の1つ以上の成分を満たした一つ以上の容器を備

える薬学的パックまたはキットを提供する。医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関が定めた形式の通知が、このような容器に付属し得、この通知は、ヒトへの投与に対する製造、使用または販売に関する政府機関による承認を表す。さらに、治療剤を他の治療用化合物と組み合わせて使用し得る。

[0165] 本発明の治療剤は、単独または他の治療剤と組合わせて投与され得る。組合わせは、例えば、混合物として同時に；同時にまたは並行してだが別々に；あるいは経時的のいずれかで投与され得る。これは、組み合わされた薬剤が、治療用混合物として共に投与されるという提示、およびまた、組み合わされた薬剤が、別々にしかし同時に、例えば、同じ個体に別々の静脈ラインを通じて投与される手順を含む。「組合わせて」の投与は、一番目、続いて二番目に与えられる化合物または薬剤のうち1つの別々の投与をさらに含む。

[0166] 特定の実施態様において、本発明の薬学的組成物は、抗がん剤との組合わせで投与される。

[0167] さらに実施形態において、本発明の治療剤は、他の治療レジメまたは予防レジメ（例えば、放射線治療）と組合わせて投与される。

[0168] 以下に実施例等により本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0169] （実施例1：ウイルスエンベロープ由来のタンパク質を含む成分中に外来遺伝子を封入した遺伝子導入ベクターの調製および使用）

（ウイルスの調製）

HVJ、Z株を、先に記載のように (Kaneda、Cell Biology: A Laboratory Handbook, J. E. Celis (Ed.), Academic Press, Orlando, Florida, vol. 3, pp. 50–57 (1994)) 差示的遠心分離により精製した。精製HVJを平衡化塩溶液 (BSS: 137mM NaCl, 5.4mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH7.5) 中に再懸濁し、そしてウイルス力価を、540nmにおける吸光度を測定することにより決定した。540nmにおける光学的密度は、15,000血球凝集単位 (HAU) に対応し、融合活性と相関する。

[0170] (遺伝子導入ベクターの調製)

3. 56mgホスファチジルコリンおよび0.44mgコレステロールの脂質混合物を、クロロホルム中に溶解し、そしてこの脂質溶液を、ロータリーエバポレーター中で蒸発させた(Uchidaら、J. Cell. Biol. 80:10-20(1979))。乾燥脂質混合物を、0.85% NP-40を含む2.0mlの上記素通り画分からのタンパク質溶液(1.6mg)中にボルテックスにより完全に溶解した。次いで、この溶液を0.3M スクロースおよび1mM KClを含む10 mMリン酸緩衝液(pH7.2)に対して透析し、NP-40を除去した。透析は、毎日緩衝液を交換して6日間実施した。この透析された溶液を、0.3M スクロースおよび1mM KClを含む10mMリン酸緩衝液(pH5.2)で平衡化したアガロースビーズ(Bio-Gel A-50m)(Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA)にアプライした。540nmにおける光学的密度が1.5を超える画分を再構成融合粒子として集め、そして以下に記載のように10mg脂質から調製された核酸充填リポソームと融合し、遺伝子導入ベクターを調製した。

[0171] (ヒトHEK293株由来のトランスフェクト細胞におけるルシフェラーゼ遺伝子発現)

上記の方法で調製した遺伝子導入ベクターの遺伝子導入活性を確認するために、ヒトHEK293株およびルシフェラーゼ遺伝子を、以下のように用いた。

[0172] pCMV-ルシフェラーゼ(7.4kb)を、pGEM-luc(Promega Corp.、Madison、WI、USA)からのルシフェラーゼ遺伝子を、pcDNA3(5.4kb)(Invitrogen、San Diego、CA、USA)中に、HindIIIおよびBamHI部位でクローニングすることにより構築した。約40 μ gのpCMV-ルシフェラーゼを含む遺伝子導入ベクターを、先に記載のように構築し、そしてこの遺伝子導入ベクター(約 1.5×10^{11} 粒子/ml、DNA濃度は約40 μ g/ml)の1/10量(100 μ l)を、ヒト293細胞株(ヒト胎児腎臓:HEK)由来の 2×10^5 細胞とインキュベートした。HVJリポソームを用いて、また同量のルシフェラーゼDNAを 2×10^5 HEK293細胞に導入した。導入24時間後、細胞を回収し、そして他に記載のように(Saekiら、Hum. Gene Ther.、8:1965-1972(1997))、ルシフェラーゼ活性アッセイを確認した。

[0173] (実施例2:界面活性剤を用いる不活性化HVJエンベロープベクターの調製および使用)

(1:HVJの増殖)

HVJは鶏の受精卵への種ウイルスの接種により増殖されたものが一般に使用され得るが、サル、ヒトなどの培養細胞、培養組織へのウイルスの持続感染系(トリプシンなどの加水分解酵素を培養液中に添加)を利用して増殖させたもの、クローニングされたウイルスゲノムを培養細胞に感染させ持続感染をおこさせて増殖させたもの、全てが利用可能である。

[0174] 本実施例において、HVJの増殖を以下のようにおこなった。

[0175] HVJの種ウイルスを、SPF(Specific pathogen free)の受精卵を使って増殖させ分離・精製したHVJ(Z種)を細胞保存用チューブに分注し、10% DMSOを加えて液体窒素中に保存し、調製した。

[0176] 受精直後のニワトリ卵を入荷し、インキュベーター(SHOWA-FURANKI P-03型;約300鶏卵収容)にいれ、36.5℃、湿度40%以上の条件で10～14日飼育した。暗室中で、検卵器(電球の光が口径約1.5cmの窓を通して出るようになっているもの)を用いて、胚の生存及び気室と漿尿膜を確認し、漿尿膜の約5mm上方に鉛筆でウイルス注入箇所の記しをつけた(太い血管を除いた場所を選定する)。ポリペプトン溶液(1%ポリペプトン、0.2% NaClを混合し、1M NaOHでpH7.2に調整してオートクレーブ滅菌し、4℃保存したもの)で種ウイルス(液体窒素からとりだしたもの)を500倍に希釈し、4℃においた。卵をイソジン及びアルコールで消毒し、ウイルス注入箇所に千枚通しで小孔をあけ、希釈した種ウイルス0.1mlを26ゲージの針付き1mlシリンジを用いて、漿尿腔内に入るように注入した。溶かしたパラフィン(融点50～52℃)をパスツールピペットを用いて孔の上に置きこれをふさいだ。卵をインキュベーターにいれ、36.5℃、湿度40%以上の条件で3日飼育した。次に、接種卵を一晩4℃においた。翌日、卵の気室部分をピンセットで割り、18ゲージの針を付けた10mlシリンジを漿尿膜の中に入れて、漿尿液を吸引し、滅菌ボトルに集め、4℃に保存した。

[0177] (2:HVJの精製)

HVJは、遠心分離による精製方法、カラムによる精製方法、または当該分野において公知のその他の精製方法によって、精製され得る。

(2. 1:遠心分離による精製方法)

手短には、増殖させたウイルス液を回収し低速遠心で培養液や漿尿液中の組織・細胞片を除去した。その上清を高速遠心(27, 500×g、30分間)とショ糖密度勾配(30〜60%w/v)を利用した超遠心(62, 800×g、90分間)により精製した。精製の間にウイルスをできるだけ穏和に扱い、4℃で保存することに注意すべきである。

[0178] 本実施例において、具体的には、以下の方法によってHVJを精製した。

[0179] HVJ含有漿尿液(HVJ含有のニワトリ卵の漿尿液を集め4℃にて保存)の約100mlを広口の駒込ピペットで50mlの遠心チューブ2本に入れ(Saeki, Y., およびKaneda, Y:Protein modified liposomes(HVJ-liposomes)for the delivery of genes, oligonucleotides and proteins. Cell Biology;A laboratory handbook(第2版)J. E. Celis編(Academic Press Inc., SanDiego)第4巻、127〜135、1998を参照のこと)、低速遠心機で3000rpm、10分、4℃で遠心し(ブレーキはオフ)、卵の組織片を除去した。

[0180] 遠心後、上清を35ml遠心チューブ4本(高速遠心用)に分注し、アングルローターで27, 000g、30分遠心した(アクセル、ブレーキはオン)。上清を除き、沈殿にBSS(10mM Tris-HCl(pH7. 5)、137mM NaCl、5. 4mM KCl;オートクレーブし、4℃保存)(BSSのかわりにPBSでも可能)をチューブ当たり約5ml加え、そのまま4℃で一晩静置した。広口の駒込ピペットでゆるやかにピペッティングして沈殿をほぐし1本のチューブに集め、同様にアングルローターで27, 000g、30分遠心した。上清をのぞき沈殿にBSS約10mlを加え、同様に4℃で一晩静置した。広口の駒込ピペットでゆるやかにピペッティングして沈殿をほぐし、低速遠心機で3000rpm、10分、4℃で遠心し(ブレーキはオフ)、除ききれなかった組織片やウイルスの凝集塊をのぞいた。上清を新しい滅菌済みチューブに入れ精製ウイルスとして4℃で保存する。

[0181] このウイルス液0. 1mlにBSSを0. 9ml加え、分光光度計で540nmの吸収を測定し、ウイルス力価を赤血球凝集活性(HAU)に換算した。540nmの吸収値1がほぼ15, 000HAUに相当した。HAUは融合活性とほぼ比例すると考えられる。また実際にニワトリ赤血球液(0. 5%)を用いて、赤血球凝集活性を測定してもよい(動物細胞利用実用化マニュアル、REALIZE INC. (内田、大石、古沢編集)P259〜268、19

84を参照のこと)。

- [0182] さらにショ糖密度勾配を用いたHVJの精製も必要に応じて行い得る。具体的には、ウイルス懸濁液を60%、30%のショ糖溶液(オートクレーブ滅菌)を重層した遠心チューブにのせ、62, 800×gで120分間密度勾配遠心を行う。遠心後、60%ショ糖溶液層上にみられるバンドを回収する。回収したウイルス懸濁液をBSSもしくはPBSを外液として4℃で透析を一晩行い、ショ糖を除去する。すぐに使用しない場合は、ウイルス懸濁液にグリセロール(オートクレーブ滅菌)と0. 5M EDTA液(オートクレーブ滅菌)をそれぞれ最終濃度が10%と2〜10mMになるように加えて−80℃で穏やかに凍結し、最終的に液体窒素中で保存する(凍結保存はグリセロールと0. 5M EDTA液の代わりに10mM DMSOでも可能)。

(2. 2: カラムおよび限外濾過による精製方法)

遠心分離による精製方法に代えて、カラムによるHVJの精製も本発明に適用可能である。

- [0183] 手短には、分子量カットオフが50, 000のフィルターによる限外濾過による濃縮(約10倍)とイオン交換クロマトグラフィー(0. 3M〜1M NaCl)による溶出を用いて精製した。
- [0184] 具体的には、本実施例において、以下の方法を使用して、HVJをカラムによって精製した。
- [0185] 漿尿液を採集した後、80 μm〜10 μmのメンブランフィルターにてろ過した。0. 006〜0. 008% BPL(最終濃度)を漿尿液に加え(4℃、1時間)、HVJを不活性化した。漿尿液を37℃、2時間インキュベートすることによって、BPLを不活性化した。
- [0186] 500KMWCO(A/G Technology, Needham, Massachusetts)を用いたタンジェンシャルフロー限外ろ過法により約10倍濃縮した。緩衝液として、50mM NaCl、1mM MgCl₂、2%マンニトール、20mM Tris(pH 7. 5)を用いた。HAUアッセイにより、ほぼ100%のHVJ回収率であり優れた結果がえられた。
- [0187] QSepharoseFF(アマシャムファルマシアバイオテックKK, Tokyo)によるカラムクロマトグラフィー法(緩衝液: 20mM TrisHCl(pH 7. 5)、0. 2〜1M NaCl)でHVJを精製した。40〜50%の回収率であり、純度は99%以上であった。

[0188] 500KMWCO (A/G Technology)を用いたタンジェンシャルフロー限外ろ過法によりHVJの画分を濃縮した。

[0189] (3:HVJの不活性化)

HVJの不活性化が必要な場合、以下に記載するように、紫外線照射またはアルキル化剤処理により行った。

[0190] (3. 1:紫外線照射法)

HVJ懸濁液1mlを30mm径のシャーレにとり、99または198ミリジュール/cm²を照射した。ガンマー線照射も利用可能である(5〜20グレイ)が完全な不活性化がおこらない。

[0191] (3. 2:アルキル化剤による処理)

使用直前に、10mM KH₂PO₄中に0.01% β-プロピオラク톤の調製をした。作業中は低温下に保ち素早く作業を行った。

[0192] 精製直後のHVJの懸濁液に最終0.01%になるようにβ-プロピオラク톤を添加し、氷上で60分間でインキュベートした。その後2時間、37℃でインキュベートした。エッペンドルフチューブにチューブあたり10,000HAU分ずつ分注し、15,000rpm、15分遠心し、沈殿を−20℃で保存する。上記の不活性化法によらず、沈殿を−20℃で保存せず、そのまま界面活性剤処理によりDNAを取り込ませ、ベクターを作成することも可能である。

[0193] (4:HVJエンベロープベクターの作成)

保存してあったHVJに外来DNA200〜800 μgを含む溶液92 μlを加えてピペッティングでよく懸濁した。この溶液は、−20℃で、少なくとも、3ヶ月保存可能である。HVJとの混合前にDNAに硫酸プロタミンを添加すると、発現効率が2倍以上増強した。

[0194] この混合液を氷上に1分間置き、オクチルグルコシド(10%)を8 μl加えて15秒氷上でチューブを振盪し、45秒氷上に静置した。界面活性剤での処理時間は、1〜5分間が好ましい。オクチルグルコシド以外に、Triton-X100(t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール)、CHAPS(3-[(3-コラミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸)、NP-40(ノニルフェノキシポリエトキシエタノール)などの

界面活性剤も使用し得る。Triton-X100、NP-40およびCHAPSの好ましい最終濃度は、それぞれ、0.24〜0.80%、0.04〜0.12%および1.2〜2.0%である。

[0195] 冷BSSを1ml添加し、すぐに15,000rpmで15分遠心した。生じた沈殿にPBSまたは生理食塩水などを300 μ l加えて、ボルテックス、ピペッティングで懸濁した。懸濁液は直接遺伝子導入に使用することも、−20℃で保存後に遺伝子導入に使用することも可能である。このHVJエンベロープベクターは、少なくとも2ヶ月間の保存後、同程度の遺伝子導入効率を維持した。

[0196] (5:HVJエンベロープベクターによる細胞内への遺伝子導入)
(遺伝子導入方法)

1,000HAU分をエッペンドルフチューブにとり(30 μ l)、硫酸プロタミン(1mg/m μ l)5 μ lを加えた。BHK-21細胞(前日に、ウェルあたり200,000個で、6つのウェルにまいたもの)の培地を交換し、1ウェルあたり0.5mlの培地(10%FCS-DMEM)を添加した。各ウェルに、上記のベクター(1,000HAU相当)と硫酸プロタミンの混合液を加え、プレートを前後左右にふってベクターと細胞を良く混ぜ合わせ、37℃で、5%CO₂インキュベーター中に10分間放置した。

[0197] 培地交換し、37℃で、5%CO₂インキュベーター中でオーバーナイト(16hr〜24hr)放置し、遺伝子発現を調べた。ルシフェラーゼ(pcLuci;CMVプロモーターを有するルシフェラーゼ遺伝子)の場合は、Cell Lysis Buffer(Promega)0.5mlで細胞を溶解し、その20 μ l溶液中の活性をルシフェラーゼアッセイキット(Promega)を用いて測定した。グリーン蛍光タンパク質(pCMV-GFPE;Promega)の場合は、そのまま蛍光顕微鏡で観察し、400倍率で5〜8視野を観察し、蛍光を発する細胞の割合を算出した。

[0198] (実施例3:ヒト心臓cDNAライブラリーからの血管内皮増殖因子をコードする遺伝子クローンp3743の単離および解析)

本発明を用いることによって、所望の機能的性質を有する目的遺伝子を分離することが可能である。その分離方法の実施形態の1つを模式的に図1に示す。

[0199] 実際に、本明細書の実施例2で調製した遺伝子導入ベクターを使用して、血管内皮増殖因子をコードする遺伝子を単離した。なお、本実施例に例示される遺伝子の

単離法には、本明細書の実施例2で調製した遺伝子導入ベクターのみならず、任意の「ウイルスエンベロープベクター」および「リボソームベクター」が使用可能である。

[0200] ヒト心臓cDNAライブラリー(GIBCO BRL社;ヒト心臓由来cDNAを、CMVプロモーターを有するプラスミドpSPORTに連結したプラスミド)をE. coli DH12Sに導入し、そのE. coliから、プラスミドを調製した。プラスミド200 μ gを、10000HAUのHVJ-E遺伝子導入ベクター(本発明の実施例2で調製した遺伝子導入ベクター、 3×10^9 particle)に封入した。宿主細胞として、ヒト大動脈内皮細胞HEAC(三光純薬)約5000細胞を、96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに培地とともに添加して、一晚培養した細胞を用いた。宿主細胞を含んだ各ウェルに対して、上記HVJ-Eの100分の1量を添加し、37°C 30分間放置した後、培地交換をした。

[0201] 使用した培地は、血清濃度を1%とした低栄養状態のもので、この状態下で、1週間培養を行う。この条件下では、HEACの増殖は確認されなかった。

[0202] 2週間後、細胞増殖アッセイを行った。試薬として、Cell Titer96(Promega社)を用い、ミトコンドリアの酸化還元状態を試薬の色調の変化として捉えて、細胞増殖の指標とした。

[0203] 最も色の濃いウェルは、最も活発に細胞増殖が行われた細胞が存在するウェルである。そこで、マイクロタイタープレート全体をプレートリーダーで読み取り、その細胞増殖を、コンピュータによりグラフ化した。このグラフから、最も増殖作用を示す2つのウェル内の細胞から、Qiagen社のDNeasy Tissue Kitを用いて、核酸を調製した。調製した核酸には、プラスミドDNAが含まれるので、これをコンピテントなE. coli(DH5 α ; 宝酒造)に熱ショック法を用いて導入した。

[0204] このE. coliをアンピシリン含有プレート培地に播種し、コロニーを形成させた。1つのウェルより調製したDNAから、約20〜200個のコロニーを得ることができた。各コロニーからプラスミドDNA(pDNA)を抽出し、制限酵素処理によって、プラスミド内の遺伝子フラグメントの存在を確認した。その結果、調製したプラスミドのうち、約60〜70%のプラスミドが、挿入物を有するプラスミドであった。

[0205] 次に、Qiagen社のEndo Free Plasmid Maxi Kitを用いて、プラスミドDNAを精製し、その精製したプラスミドをHVJ-Eに封入して、再度HAEC細胞に導入し、

同様の細胞増殖実験を行った。この細胞増殖実験において、有意に高い細胞増殖を示したプラスミドが、血管内皮増殖因子をコードする核酸を含むことが予想される候補プラスミドである。

[0206] インサートをもつ9個のクローンをそれぞれHVJ-Eに封入して2回目のスクリーニングを施行したところ、高い増殖作用を示す遺伝子が得られた。さらに新たに2つ得られ計3つの遺伝子が常に高いHAEC増殖能を示した。この3つについては再検、再々検によってもHAEC増殖能が確認された。増殖能をさらに確認するために、細胞増殖の最初期に活性化されるプロトオンコジーンc-fosのプロモーターを用いたアッセイを行った。実際にはこのプロモーター下にルシフェラーゼを連結した遺伝子c-fos-Luciと候補遺伝子を1:1の重量比でウシ血管内皮細胞にリポフェクションによって導入し24-48時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。プラスミドc-fos-Luciは、c-fosの5'調節エンハンサー領域(-357~-276)を2コピー、そして単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子のプロモーター(-200~-70)、およびルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドである(Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002:22:238-242)。図2に示すように、3つの遺伝子(p3743、M3-10-G08、M3-13-A06)はHGFよりも高いルシフェラーゼ活性を示し、これら遺伝子産物によるc-fosプロモーターの強力な活性化が示された。この中で最も高い活性を示したp3743についてVEGFプロモーターを連結したルシフェラーゼ遺伝子を用いて上述のようにプロモーターアッセイを行ったところ、図3の右の図のようにVEGFよりも高いVEGFプロモーターの活性化を示した。すなわちこの遺伝子産物によりVEGFの分泌が促進され、既知の血管新生遺伝子の活性化を行うことによる血管新生の可能性が示された。ちなみに図3の左のグラフにあるようにp3743はVEGFよりもc-fosプロモーターの活性化能は高かった。次にp3743の細胞増殖能についてヒト大動脈内皮細胞(HAEC)とヒト血管平滑筋細胞(VSMC)に対して調べたところ、図4のようにHAECを宿主細胞として用いた場合、単離した核酸は、HGFよりも高い増殖能を有していた。しかし、ヒト血管平滑筋細胞を用いた場合は、ネガティブコントロールのGFPと同様の活性であった。

[0207] (1. 血管新生活性)

クラボウの血管新生キット(Angiogenesis Kit, KZ-1000, 倉敷紡績株式会社)を用い

て管腔形成を調べた。対照として、ブランク、血管内皮細胞増殖因子-Aタンパク質(VEGF-A)、pVEGFプラスミド(血管内皮細胞増殖因子をコードする遺伝子を含むプラスミド)、pSPORT1(血管内皮細胞増殖因子をコードする遺伝子を含まないプラスミド)を用いた。

[0208] 血管新生専用培地(倉敷紡績(株)KZ-1400)中へ、VEGF-E(NZ-7)10ng/mlを添加した培地へ、さらに抗ヒトVEGF-A中和抗体を0、250、500、1000ng/mlの各濃度となるように添加して培養した。

[0209] 抗ヒトVEGF-A中和抗体としては、Anti-VEGF、Human,Mouse-Mono(26503.111)(R&D社製 カタログNo.MAB293)を用いた。培養は37℃、5%CO₂ インキュベーターにて行った。培地は、培養4日目、7日目および9日目に同じ添加物を含有するものと交換した。培養開始11日目に培地を除き、管腔染色キット(CD31抗体染色用:倉敷紡績(株)KZ-1225)を用いて以下の手順に従い染色した。

[0210] CD31(PECAM-1)染色1次抗体(マウス抗ヒトCD31抗体)をブロッキング液(1%-BSAを含むダルベッコ リン酸緩衝液(PBS(-)))で4,000倍希釈した。各ウェルにこの1次抗体溶液0.5mlを添加し、60分間37℃でインキュベートした。インキュベート終了後、1mlのブロッキング液で各ウェルを計3回洗浄した。

[0211] 次いでブロッキング液で500倍希釈した2次抗体溶液(ヤギ抗マウスIgGアルカリホスファターゼ複合体)0.5mlを各ウェルに添加し、60分間37℃でインキュベートした後、1mlの蒸留水で3回洗浄した。その間に、BCIP/NBTの錠剤2錠を蒸留水20mlに溶解し、ポアサイズ0.2μmのフィルターで濾過して基質溶液を準備した。調製したBCIP/NBT基質溶液0.5mlを各ウェルに添加し、管腔が深紫色になるまで(通常5〜10分間)37℃でインキュベートした。インキュベート終了後、蒸留水1mlで、各ウェルを3回洗浄した後洗浄液を吸引除去し、自然乾燥するため静置した。乾燥後、顕微鏡下で各ウェルを観察した。

[0212] 各ウェルを40倍の顕微鏡で観察し、各ウェルの写真を撮影した。また、1mmのスケールを40倍に拡大した写真を撮影した(図5)。HAECに遺伝子導入をして、その上清を用いたところ、図5のように管腔形成がおこった。p77421は増殖活性のなかった心臓遺伝子ライブラリーの1遺伝子である。

[0213] 得られた各画像を、以下の方法に従い血管新生定量ソフトウェア(KSW-5000U, 倉敷紡績株式会社)を用い定量化した。様々な指標でコンピューター解析をして、このスケールをもとに各視野中に形成された管腔の面積(図6左欄)、長さ(図6右欄)、を測定した。その結果、図6のように形成管腔の面積、長さともp3743が有意に高かった。

[0214] (2. 配列決定)

配列決定を行ったところ、癌抗原遺伝子として報告のあったSART-2(塩基配列No.1-3958)のC末221個のアミノ酸よりなるポリペプチド断片(SART-2の塩基配列No.2364-3958;配列番号3)であった。このなかで蛋白をコードできる候補は2つあり、それらはSART-2とインフレームであるf1(塩基配列No.2764-3073;配列番号4),SART-2とはフレームがずれているF2(塩基配列No.2660-2750;配列番号1)であったので、これら遺伝子断片をPCRで増幅してCMVプロモーターをもつ発現ベクターpCDNA3.1につないだ(図7)。これら遺伝子の細胞増殖能をc-fosプロモーターアッセイで行ったところ、f1は活性がなく、F2はVEGFと同等の活性を有していた(図8)。なおHGFとVEGFのc-fosプロモーターアッセイ活性化能はほぼ同等であった。そこでF2ペプチドについて以下解析を進めた。

[0215] (実施例4:F2ペプチドの機能解析)

(1. MTSアッセイによるHEAC細胞増殖能の解析)

F2ペプチドを合成し、その様々な量をHAECと接触させ、増殖能をMTSアッセイによって調べた。MTSアッセイとは、MTTアッセイの変法であって、培養中の生細胞によりテトラゾリウム塩(MTS)を発色産物ホルマゼンに還元する反応をベースにした生細胞の測定方法である。具体的には、以下のように行う。

- ・HAECを750細胞／ウェルで96ウェルプレートに播種した
- ・100 μ l／ウェルの内皮細胞用培地(1%FBS、EGF添加なし)にそれぞれのサンプルを2 μ l／ウェルずつ添加した。毎日(6日目まで)2 μ l／ウェルを添加した(培地交換はしない)。
- ・1ウェルあたり、測定溶液(Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega社))を20 μ l添加し、100 μ lの内皮細胞用培地と混合し、古い培

地を吸引して除いた。測定溶液と細胞の混合溶液を1ウェルあたり120 μ l入れてCO₂インキュベーターで1〜5時間インキュベートした。

・プレートリーダーにて490nmの吸光度を測定した。

[0216] サンプル群(各8ウェルずつ)は、以下のとおりである。

NC:1% FBSを添加したEBM培地(内皮細胞用培地)のみ。他のサンプルは、この血清添加した培地に、各種ペプチドを添加した。

VEGF-A:組換えVEGF-A(KURABO社)を、終濃度が10ng/mlになるように添加した。

F2-1:F2ペプチドを、終濃度が1ng/mlになるように添加した。

F2-10:F2ペプチドを、終濃度が10ng/mlになるように添加した。

F2-100:F2ペプチドを、終濃度が100ng/mlになるように添加した。

F2-1000:F2ペプチドを、終濃度が1000ng/mlになるように添加した。

その結果、図9に示すように、VEGF蛋白と同様に、用量依存的に、F2ペプチドの細胞増殖能を認めた。この結果は、F2ペプチドがVEGFよりも強いHEAC増殖促進活性を有することを示す。F2ペプチドのアミノ酸配列は、

MLSLIFLHRLKSMRKRLDRKLRFWHRKNYP(配列番号2)の30アミノ酸であり、正に荷電したヘリックスペプチドであり、天然には存在しない人工的活性ペプチドであることが明らかになった。このペプチドは、その構造自体も、さらにその活性の報告も全くない新規物質である。

[0217] (2. 内皮細胞HEACの細胞遊走に対するF2ペプチドの影響)

HEAC内皮細胞の遊走を、改変したBoydenチャンバー(Rikitake, Yら, Arterioscler Thromb Vasc Biol 20, 1006-1012(2000))を使用して、アッセイした。8 μ の孔を有する、ポリビニルピロリドン(PVP)を含まないポリカーボネートメンブラン(Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD)を、オーバーナイトで、0.1%ゼラチンでコートし、そしてリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄して、過剰のゼラチンコーティングを除去した。次に、1%のFBSを補添した増殖因子を含まない28 μ lのEBM2培地を、下部のチャンバーに配置し、その下部チャンバーの上にメンブランを配置し、そして、 1×10^6 細胞/mlの細胞を、VEGF-A(50ng/ml, Kurabo、大阪)、F2

ペプチド(10ng/ml、100ng/ml、1 μ g/ml)、またはコントロールペプチド(1 μ g/ml; アミノ酸配列RSLEGTDRFPFVRLKNSRKLEFKDIKGIKR; 配列番号6)のいずれかを含む、50 μ lのEBM2培地中に懸濁した。Boydenチャンバーを、37℃で4時間インキュベーションした。インキュベーション後、メンブランを除去し、そして、メンブランの上側の細胞を、はがした。メンブランの下側の細胞を、Diff-Quick(Sysmex、兵庫)で染色した。細胞数を、100倍の視野下で、ランダムに選択した8視野について、計数した。

[0218] 内皮細胞HEACを、F2ペプチドで処理した場合には、濃度依存的に(0.01～1 μ g/ml)、細胞遊走活性が顕著に増加した。結果を、図10と以下の表1に示す。

[0219] [表1]

	コントロール 1 μ g/ml	VEGF 50ng/ml	F2 10ng/ml	F2 100ng/ml	F2 1 μ g/ml
% 増加	-10.1	53.8	88.5	102.5	129.8
標準誤差	7.472	7.505	15.11	7.038	13.794

この内皮細胞の移動は、1 μ g/mlのコントロールペプチドでは、観察されなかった(Ctrlとして示す)。内皮細胞遊走に対するF2ペプチドの効果は、VEGF(50ng/ml)よりも大きかった。この結果は、F2ペプチドがVEGFよりも強いHEAC細胞遊走促進活性を有することを示す。

[0220] (3. F2ペプチドのインビトロ血管新生活性の確認)

F2ペプチドによる処理によるインビトロでの血管新生促進を調べることによって、F2ペプチドの血管新生活性を確認した。血管形成活性の試験は、実施例3の1. 血管新生活性の節に記載される方法に従い、VEGF-A(50ng/ml)、F2ペプチド(0.1, 1, 10 μ g/ml)、およびコントロールペプチド(1, 10 μ g/ml)を用いて、行った。

[0221] F2ペプチドで処理をした場合は、組換えVEGF(50ng/ml)またはコントロールペプチドで処理をした場合と比較して、より大きな血管形成が確認された。結果を、図11と以下の表2に示す。

[0222] [表2]

	コントロール 1 μ g/ml	コントロール 10 μ g/ml	VEGF-A 50ng/ml	F2 100ng/ml	F2 1 μ g/ml	F2 10 μ g/ml
%増加						
面積	-12	-9	37	61	55	132
長さ	-11	-3	40	53	50	116
標準誤差						
面積	6	6	15	18	12	38
長さ	6	6	14	15	10	28

この結果は、F2ペプチドがVEGFよりも強い血管新生促進活性を有することを示す。

[0223] (4. F2ペプチドのインビボ血管新生活性の確認)

F2ペプチドのインビボ血管新生促進活性を試験するために、マトリゲルプラグアッセイ(Matrigel plug assay; Rikitake, Yら、Arterioscler Thromb Vasc Biol 20, 1006-1012(2000))を行った。増殖因子を枯渇したマトリゲル(0.5ml, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)を、VEGF-A(50ng/ml)、F2ペプチド(1 μ g/ml)、コントロールペプチド(1 μ g/ml)、または何も加えない状態(ネガティブコントロール)のいずれかとともに、40U/mlのヘパリン(Aventis Pharma, 東京)と混合した。次に、混合物を、オリエンタルバイオサイエンス社(京都)から得たC57BL/6雌性マウスの皮下に注入した。7日後、マウスを屠殺し、プラグを回収して、メタノール中で固定した。免疫染色のために、切片を、抗CD31(PECAM-1)モノクローナル抗体(1:100希釈、BD Pharmingen, San Diego, CA)と、4℃で、オーバーナイトでインキュベーションし、次に、Alexa Flour488二次抗体(1:1000, Molecular Probes, Eugene, OR)と、写真撮影前に2時間インキュベーションした。全ての実験プロトコールは、大阪大学大学院医学部動物委員会の承認を得た。

[0224] F2ペプチドを含むマトリゲルを受けたマウスでは、コントロールペプチドを含むマトリゲルを受けたマウスと比較して、インタクトな赤血球を含む新生された血管が多かった。結果を図12に示す(100倍)。

[0225] F2処置していない群と比較して、F2処置した群では、新生血管がより多く見られることを、抗CD31抗体を用いる免疫染色によって確認した。結果を図13に示す(100倍)。上記で実証された結果とこれらのデータによって、F2ペプチドが、内皮細胞移動の増加、および内皮細胞のF2ペプチドを含むゲルへの侵入を誘導することが示された。

[0226] (実施例5:抗菌活性、血管新生活性、および動脈形成活性を有するペプチドLL-37と、F2ペプチドとの比較)

F2ペプチドと構造上相同であるタンパク質は、データベースサーチによって見出されなかった。構造分析の結果、F2ペプチドは、 α -ヘリックス構造を形成することから、膜と相互作用し、そして抗菌活性を有することが示唆された。LL-37ペプチドは、抗菌活性、血管新生活性、および動脈形成活性を有するペプチドであることが公知である。実際にLL-37ペプチドは、アルギニンに富み、そして α -ヘリックス構造をとる点において、F2ペプチドと類似する。従って、F2ペプチドとLL-37との効果を比較した。その結果、MTSアッセイを用いる内皮細胞増殖アッセイにおいては、両ペプチドは、同程度の活性を示した。結果を、図14と以下の表3に示す。

[0227] [表3]

	F2 100ng/ ml	F2 1 μ g/ml	LL37 100ng/ ml	LL37 1 μ g/ml
増加[倍]	1.23	1.475	1.279	1.361
標準誤差	0.04	0.07	0.09	0.09

しかしながら、血管形成活性に関しては、F2ペプチドは、LL-37ペプチドよりも、10 μ g/mlの投与量において、高い活性を示した。結果を、図15と以下の表4および表5に示す。

[0228] [表4]

	LL37 1 μ g/ml	LL37 10 μ g/ml	F2-1 1 μ g/ml	F2-10 10 μ g/ml
面積(%増加)	70.1	43	41.8	131.4
標準誤差	7.1	6.1	13.6	6.9

[0229] [表5]

	LL37 1 μ g/ml	LL37 10 μ g/ml	F2-1 1 μ g/ml	F2-10 10 μ g/ml
長さ(%増加)	60.9	28	38.5	115.5
標準誤差	6.9	6	12.1	6

[0230] 以前の研究によって、ERK (Extracellular Signal-related Kinase) およびホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ/Akt (PI3K/Akt) 活性が、LL-37によって迅速に増加することが公知である。これに対して、F2ペプチドは、ERK活性に対しても、PI 3K/Akt活性に対しても、直接的な効果を有しなかった(データ示さず)。しかし、図16と以下の表6に示すように、F2ペプチドは、72時間の間、時間依存的にインスリン様増殖因子-1 (IGF-1) のmRNAレベルを、強力かつ特異的にアップレギュレートした。

[0231] [表6]

	FGF-2	TGF- β	IGF-1	eNOS	CTGF
24 hrs	5.7	2.6	46.2	0.1	0.2
48 hrs	6.0	13.6	97.9	6.1	1.1
72 hrs	9.4	1.6	243.8	0.7	0.5

(増加量[倍])

[0232] その一方で、F2ペプチドは、線維芽細胞増殖因子 (FGF-2)、トランスホーミング増殖因子 (TGF- β)、内皮細胞一酸化窒素シンターゼ (eNOS)、または結合組織増殖因子 (CTGF) のいずれについても、そのmRNAレベルに影響しなかった。F2ペプチドによって誘導されたIGF-1発現の増加は、重要である。なぜなら、IGF-1は、血管新生作用を有し、そして血管再構築に関与する広範なスペクトルを有する増殖因子として作用するからである。さらに、IGF-1は、低酸素誘導性因子 α 、およびその下流のエフェクターであるVEGFを刺激し、それによって、血管新生を促進する。これらの結果は、F2がIGF-1による血管新生を誘導できることを示す。

[0233] 以上の結果は、F2ペプチドの効果に持続性があることを示すものである。そのため、F2ペプチドは、臨床における血管新生治療に適切であり得る。F2ペプチドの二次的な効果としては: 1) IGF-1を介したVEGF発現のアップレギュレーション; および、2) IGF-1を介してAktを活性化し、その後に、eNOS活性化、または抗アポトーシス効果を生じ得る、それによって、さらに血管新生を促進する。さらに、IGF-1はまた、

筋発生および創傷治癒を刺激し、組織の修復をもたらすことができる。従って、F2ペプチドは、創傷治癒および組織修復においても、有用である。

[0234] (実施例6: 単離した遺伝子クローンにコードされるポリペプチド、ポリヌクレオチドを用いる疾患の処置)

本願発明の組成物を用いて、被検体における血管新生を促進することができる。実施例2に従って、HVJエンベロープベクターにF2ペプチド発現ベクターを封入する。SDラット(400–500g; 日本チャールズリバー社)に対しベントバルビタール・ナトリウム塩(0.1ml/100mg)を腹腔内投与して麻酔し、保温して自動呼吸器により呼吸を確保する。ラットに左側開胸術を施し、HVJエンベロープベクター(20 μ l)を30Gの注射針を用いて、心尖に直接、慎重に注入する。

[0235] (試験例1: HVJエンベロープベクター感作ラット冠動脈内皮細胞のF2ペプチドの発現)

HVJエンベロープベクター(ベクター中のF2ペプチド発現ベクター濃度: 10 μ g/ml)を、ラット冠動脈内皮細胞(細胞数: 10^8 個)に感作し、F2ペプチドの産生量をELISA法で測定する。また、対照として、F2ペプチド発現ベクターを含まないエンベロープベクターを用いて、上記と同様な試験を行う。更に、非感作ラット冠動脈内皮細胞についてもF2ペプチド産生量を測定する(無処置群)。HVJエンベロープベクターを感作したラット冠動脈内皮細胞は高いレベルでF2ペプチドを産生し、分泌することを確認する。

[0236] (試験例2: 内皮細胞の増殖に対するF2ペプチド発現ベクターの効果)

ヒト内皮細胞にHVJエンベロープベクターを感作し、外因的に添加したヒトF2ペプチドの存在下(1、10及び100ng/ml)又は非存在下に培養し、細胞数の増加率(%)を測定する。外因的に添加したF2ペプチドにより内皮細胞の増殖は促進されることを確認する。一方、HVJエンベロープベクター(濃度: 10 μ g/ml)を感作した内皮細胞を培養し、細胞数の増加を測定し、増加率(%)を求める。HVJエンベロープベクターを感作した内皮細胞の増加率が対照(発現ベクターを含まないHVJエンベロープベクター)に比べて著しく高いことを確認する。更に、上記のHVJエンベロープベクターを感作した内皮細胞の培養をウサギ抗ヒトF2ペプチド抗体の存在下又は非存在下に行

ない、細胞数の増加を測定し、増加率(%)を求める。

- [0237] (試験例3:HVJ-リボソーム-DNAを直接注入したラット心筋における新生血管増生)

F2ペプチド発現プラスミドを含むHVJエンベロープベクターを直接注入したラット心筋、ペプチド発現プラスミドを含まないHVJエンベロープベクターを直接注入したラット心筋及び無処置のラット心筋をHE染色、Azan染色し、検鏡して微小血管数を数える。F2ペプチド発現プラスミドを含むHVJエンベロープベクターを注入したラット心筋では、ペプチド発現プラスミドを含まないHVJエンベロープベクターを注入したラット心筋及び無処置のラット心筋と比較して、有意に微小血管数が増加することを確認する。

- [0238] (試験例4:HVJエンベロープベクターを関節内に直接導入することによる関節軟骨の修復)

10週齢のフィッシャーラットの大腿骨顆間部に直径1.8mmのキルシュナー鋼線を用い軟骨下骨を貫く損傷を作製する。術後1週の時点で、実施例2のHVJエンベロープベクター(100 μ l/膝)を直接的に関節内へ導入する。コントロールとして、発現プラスミドを含まないHVJエンベロープベクターを同量関節内に投与する。これらの遺伝子等の導入後1、3、4週でラットを屠殺し、組織学的に修復部位を観察する。F2ペプチド発現プラスミドを含むHVJエンベロープベクターの関節内への投与後3週で修復組織の一部にトルイジンブルー染色にて染色されるプロテオグリカンの合成を認める軟骨様細胞の出現を確認する。

- [0239] (実施例7:F2ペプチドによる抗菌活性の確認)

実施例5に示したように、F2は、その構造解析の結果から、抗菌活性を有することが予測された。そこで、F2が実際に抗菌活性を有することを確認する。

- [0240] (抗菌活性の評価法)

抗菌活性を、米国National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCL Documents M7-A3)に従って評価する。すなわち、マイクロタイタープレートを用いて、菌の増殖を阻害するペプチドの最小濃度を求める。細菌を、培地で16時間培養した後、 A_{600} における吸光度を測定する。予め求めた濁度とcolony

forming unit (CFU)との相関から、規定のCFUになるように培地で希釈する。各菌株を 5×10^5 CFU/ml (最終濃度) 程度になるように添加する。各ペプチドの5mM水溶液、および培地を用いた1.6mM溶液を調製し、ここから段階希釈を行う。菌液50 μ lを分注したマイクロプレートに各濃度段階のペプチドを50 μ lずつ分注する(ペプチドの最終濃度は3.1 μ M〜800 μ M)。ペプチド無添加のものをネガティブコントロールとする。プレートを37°Cで18時間静置培養し、菌の増殖を阻害する最小濃度(最小発育阻止濃度: MIC)を求める。結果として記載される濃度はMIC (μ M)である。この方法に従って、F2ペプチドの抗菌活性を測定する。

[0241] 以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、この実施形態に限定して解釈されるべきものではない。本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。当業者は、本発明の具体的な好ましい実施形態の記載から、本発明の記載および技術常識に基づいて等価な範囲を実施することができることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

産業上の利用可能性

[0242] 血管新生活性を有する新規のペプチド、およびそのペプチドをコードする遺伝子を単離することによって、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、末梢血管病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置、予防、および予後のための新規の薬学的組成物が提供される。さらに、本発明のペプチドを含む抗菌組成物もまた提供される。

請求の範囲

[1] 以下:

(a) 配列番号1に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を含む、ポリヌクレオチド;

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする配列を含む、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド、;

(d) (a) ~ (c) のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド; および

(e) (a) ~ (c) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなるポリヌクレオチド、
からなる群から選択されるポリヌクレオチドであって、ここで、前記ポリヌクレオチドは、血管内皮細胞増殖活性、c-fosプロモーターからの転写促進活性、VEGFプロモーターからの転写促進活性、および血管新生活性からなる群から選択される活性を有するペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

[2] 配列番号1に記載の塩基配列を有する、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

[3] 配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

[4] 血管新生活性を有するペプチドをコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

[5] 血管内皮細胞増殖活性を有するペプチドをコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

[6] 請求項1に記載のポリヌクレオチドを含有する、血管新生のための薬学的組成物。

[7] 請求項1に記載のポリヌクレオチドを含有する、血管内皮細胞増殖のための薬学的組成物。

[8] 請求項1に記載のポリヌクレオチドを含有する、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置のための薬学的組成物。

- [9] 組織の血管新生を生じさせる方法であって、以下；
- (1) 血管新生を生じさせる組織を提供する工程；および
 - (2) 該血管内皮細胞に請求項1に記載のポリヌクレオチドを含む核酸を導入する工程、を包含する、方法。
- [10] 前記血管新生は、インビボ、エキソビボまたはインビトロで行われる、請求項9に記載の方法。
- [11] 前記組織は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患を含む状態にある、請求項9に記載の方法。
- [12] 血管内皮細胞を増殖させる方法であって、以下；
- (1) 血管内皮細胞を提供する工程；および
 - (2) 該血管内皮細胞に請求項1に記載のポリヌクレオチドを含む核酸を導入する工程、を包含する、方法。
- [13] 前記血管内皮細胞の増殖は、インビボ、エキソビボまたはインビトロで行われる、請求項12に記載の方法。
- [14] 前記血管内皮細胞は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患を含む組織中にある、請求項12に記載の方法。
- [15] 請求項1に記載のポリヌクレオチドを含む、プラスミド。
- [16] 請求項1に記載のポリヌクレオチドを含む、遺伝子導入ベクター。
- [17] 血管内皮細胞を増殖させる方法であって、以下；
- (1) 血管内皮細胞を提供する工程；および
 - (2) 該血管内皮細胞に請求項16に記載の遺伝子導入ベクターを接触させる工程、を包含する、方法。
- [18] 請求項1に記載のポリヌクレオチドによってコードされる、ポリペプチド。
- [19] 以下：
- (a) 配列番号1に記載の塩基配列またはそのフラグメントによってコードされるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド；

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む、ポリペプチド、

(c) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチド;および

(d) (a) ~ (c) のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなる、ポリペプチド、からなる群から選択されるポリペプチドであって、ここで、前記ポリペプチドは、血管内皮細胞増殖活性、c-fosプロモーターからの転写促進活性、VEGFプロモーターからの転写促進活性、および血管新生活性からなる群から選択される活性を有する、ポリペプチド。

[20] 配列番号1に記載の塩基配列によってコードされる、請求項19に記載のポリペプチド。

[21] 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する、請求項19に記載のポリペプチド。

[22] 血管新生活性を有する、請求項19に記載のポリペプチド。

[23] 血管内皮細胞増殖活性を有する、請求項19に記載のポリペプチド。

[24] 請求項19に記載のポリペプチドを含有する、血管新生のための薬学的組成物。

[25] 請求項19に記載のポリペプチドを含有する、血管内皮細胞増殖のための薬学的組成物。

[26] 請求項19に記載のポリペプチドを含有する、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置のための薬学的組成物。

[27] 組織の血管新生を生じる方法であって、以下;

(1) 血管新生する組織を提供する工程;および

(2) 該血管内皮細胞に請求項19に記載のポリペプチドを接触させる工程、を包含する、方法。

[28] 前記血管新生は、インビボ、エキソビボまたはインビトロで行われる、請求項27に記載の方法。

[29] 前記組織は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗

塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患を含む状態にある、請求項27に記載の方法。

[30] 血管内皮細胞を増殖させる方法であって、以下；

(1) 血管内皮細胞を提供する工程；および

(2) 該血管内皮細胞に請求項18に記載のポリペプチドを接触させる工程、を包含する、方法。

[31] 前記血管内皮細胞の増殖は、インビボ、エキソビボまたはインビトロで行われる、請求項30に記載の方法。

[32] 前記血管内皮細胞は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患を含む組織中にある、請求項30に記載の方法。

[33] 請求項1に記載のポリヌクレオチドを含む抗菌剤。

[34] 請求項18または19に記載のポリペプチドを含む抗菌剤。

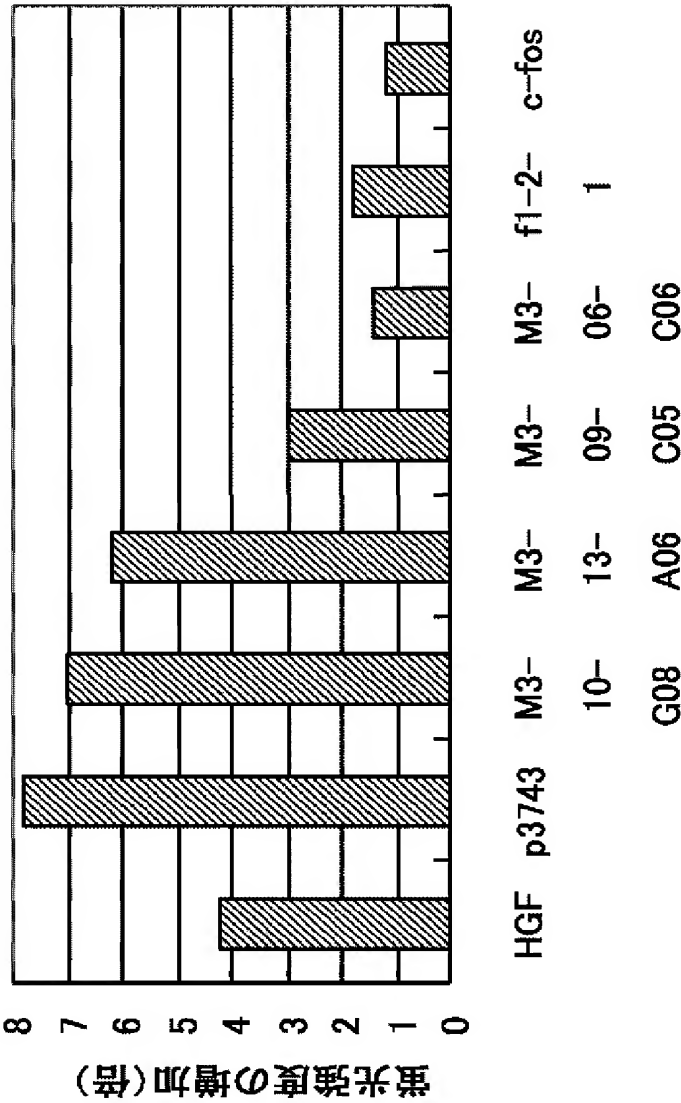
[35] 請求項1に記載のポリヌクレオチドを含む、感染症を処置するための薬学的組成物。

[36] 請求項18または19に記載のポリペプチドを含む、感染症を処置するための薬学的組成物。

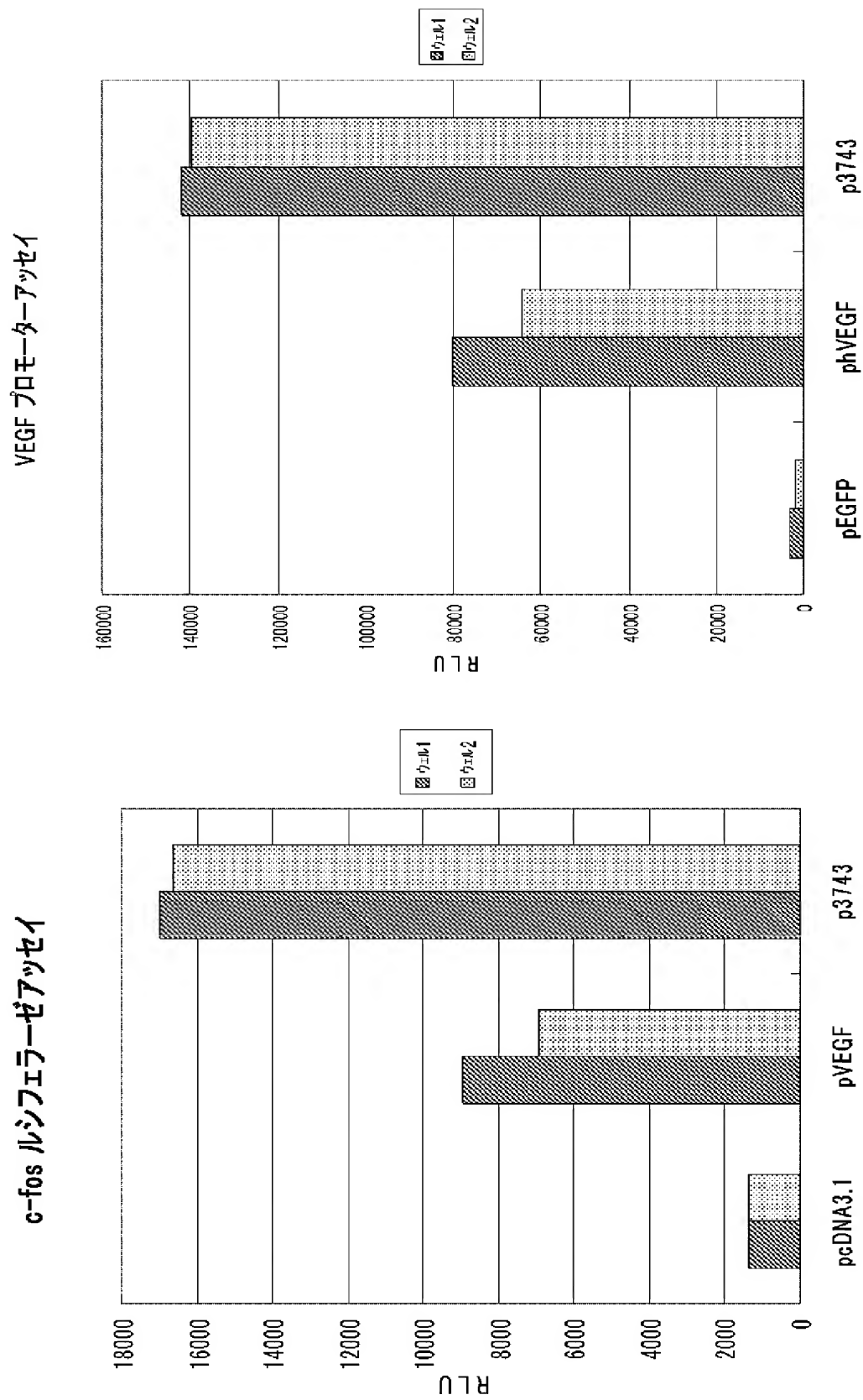
[37] 請求項1に記載のポリヌクレオチドを含む、IGF産生増強のための組成物。

[38] 請求項18または19に記載のポリペプチドを含む、IGF産生増強のための組成物。

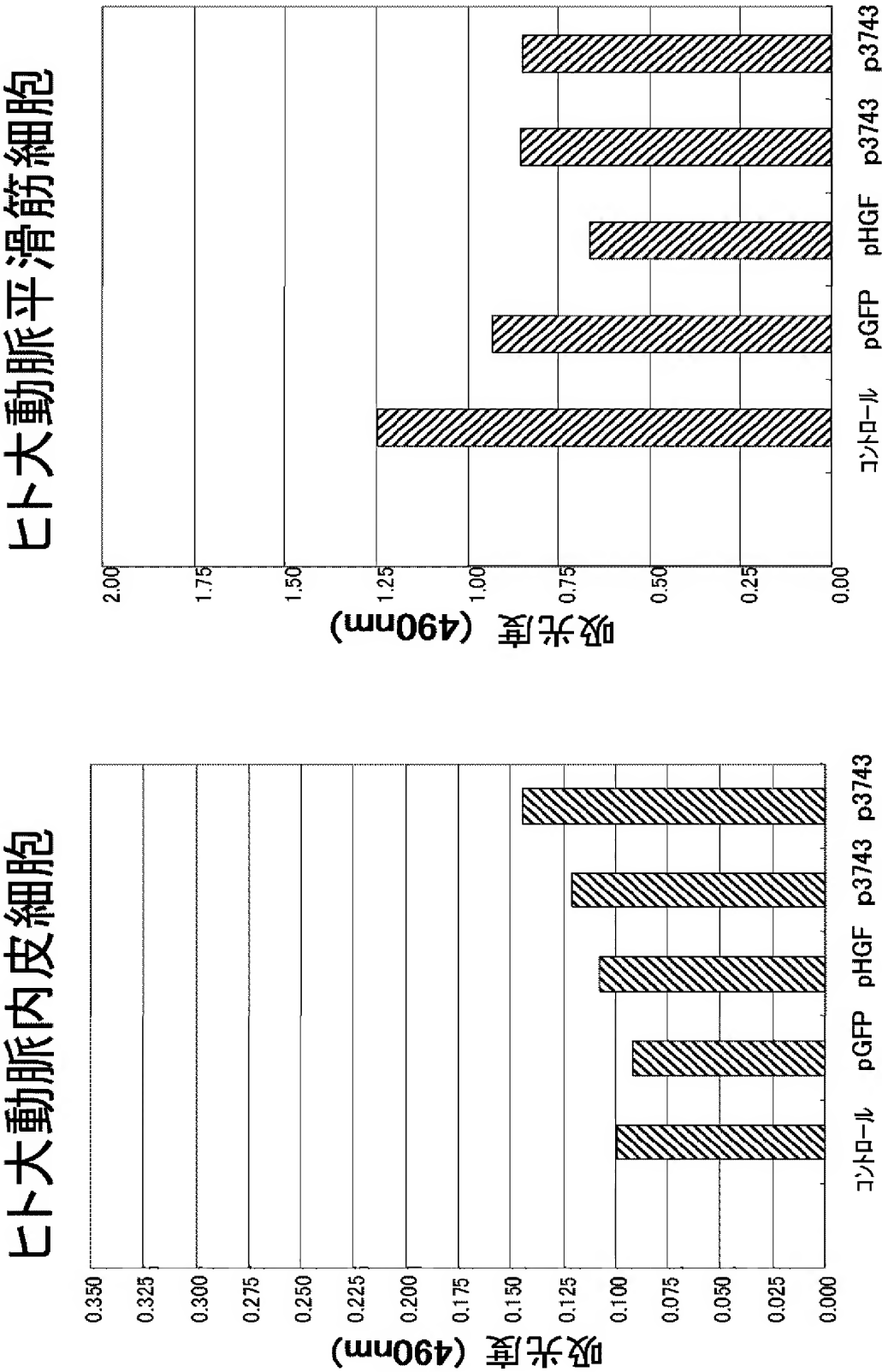
[図2]



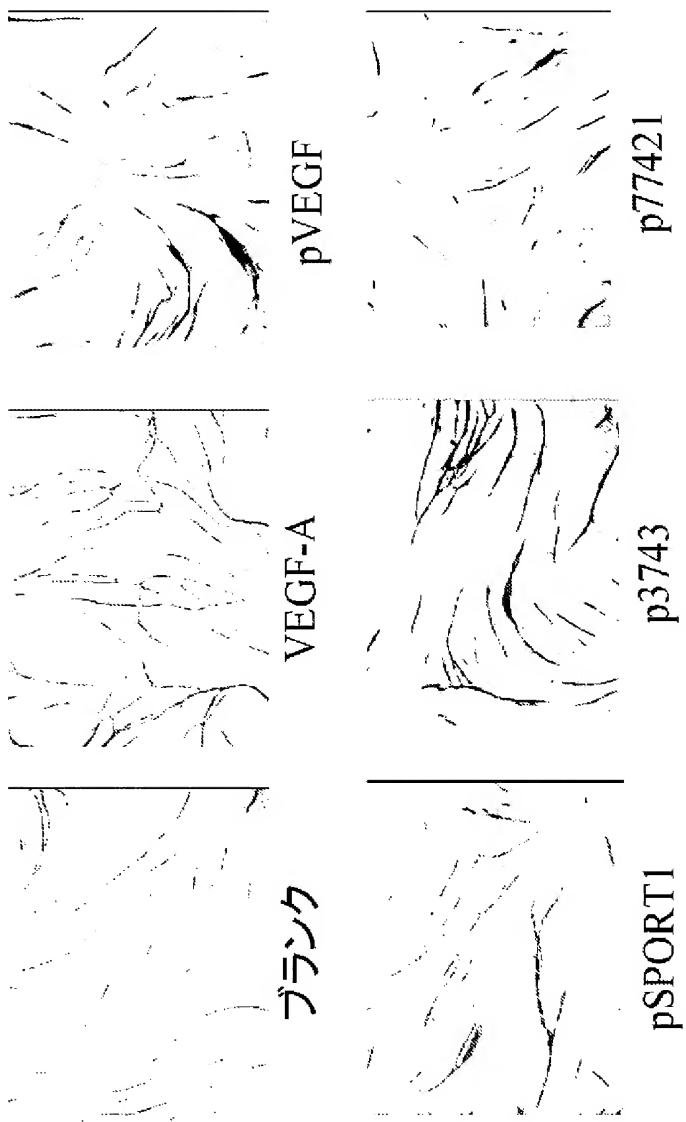
[図3]



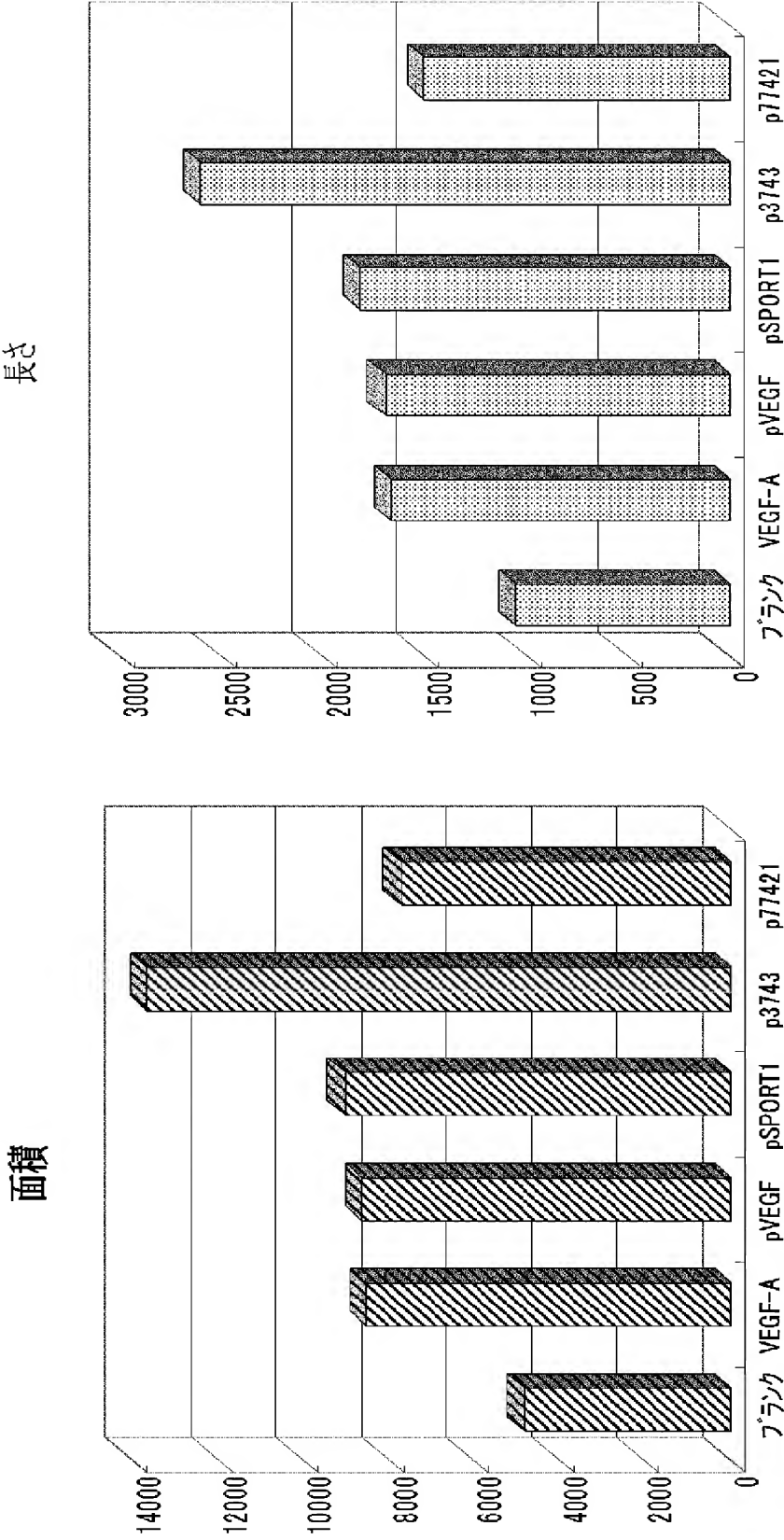
[図4]



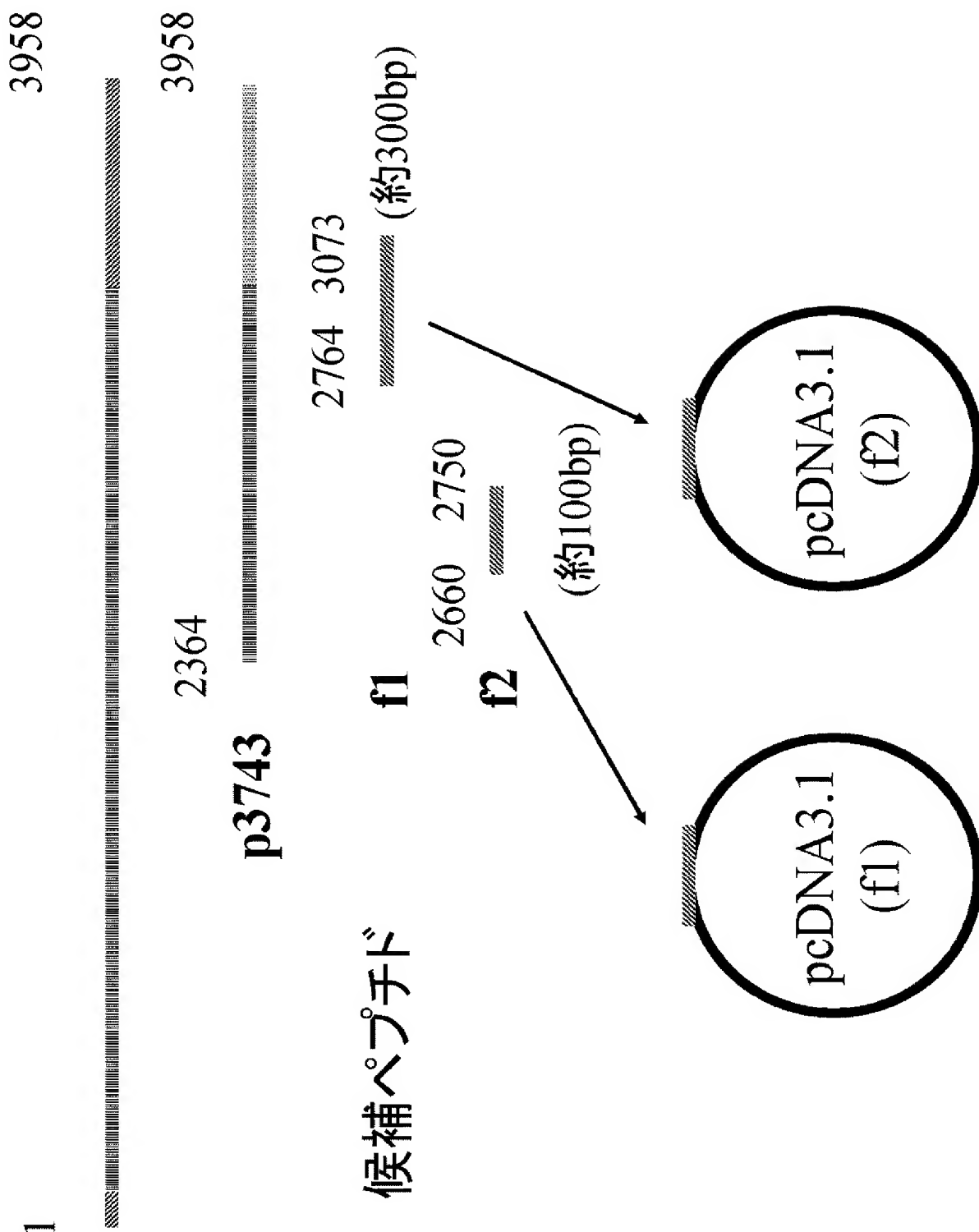
[図5]



[図6]

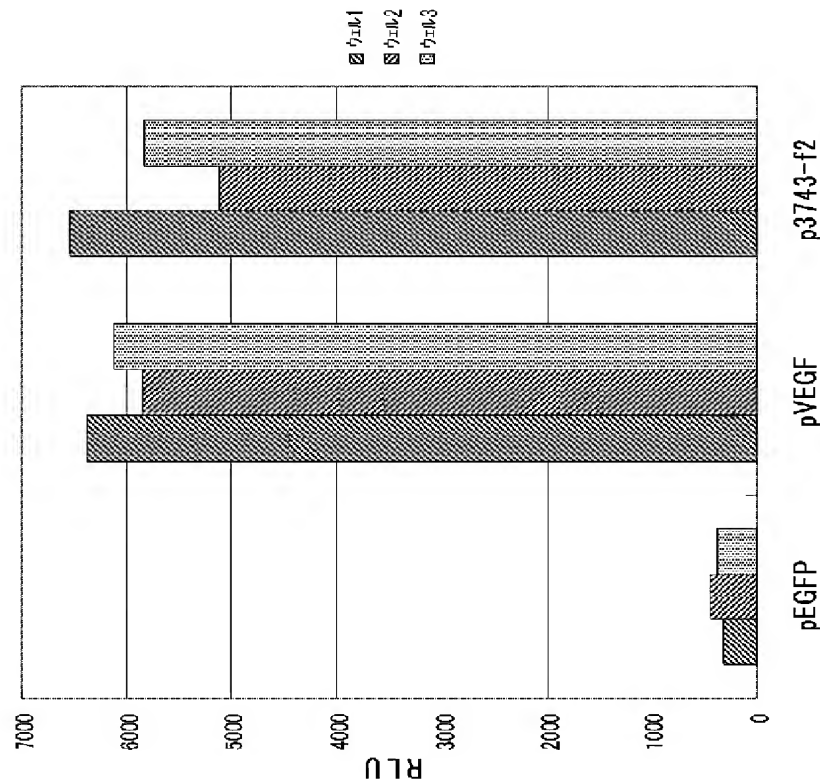


[図7]

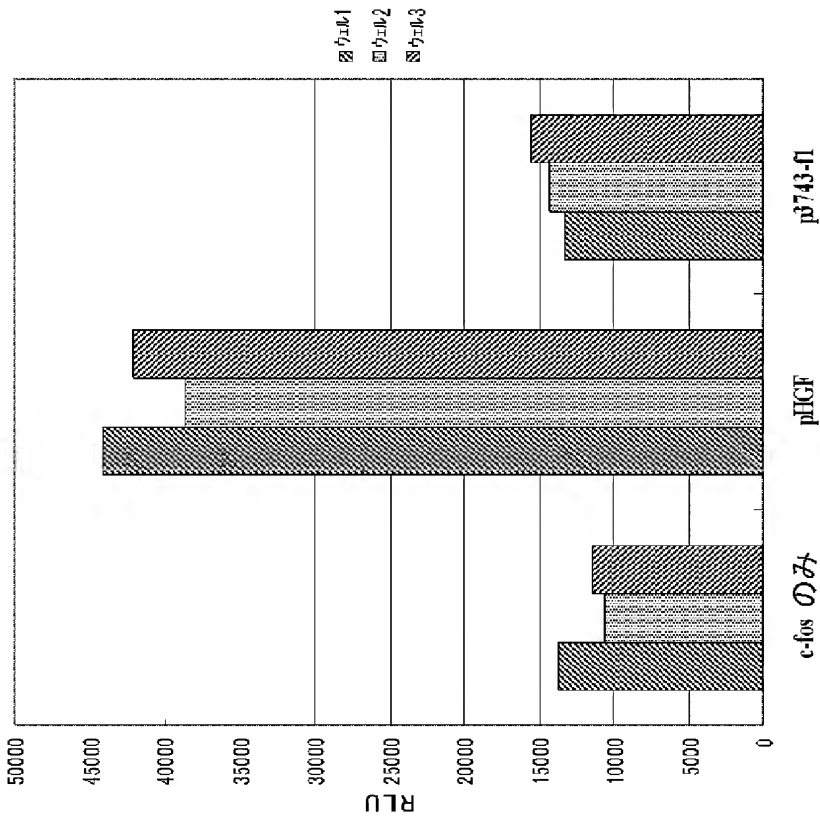


[図8]

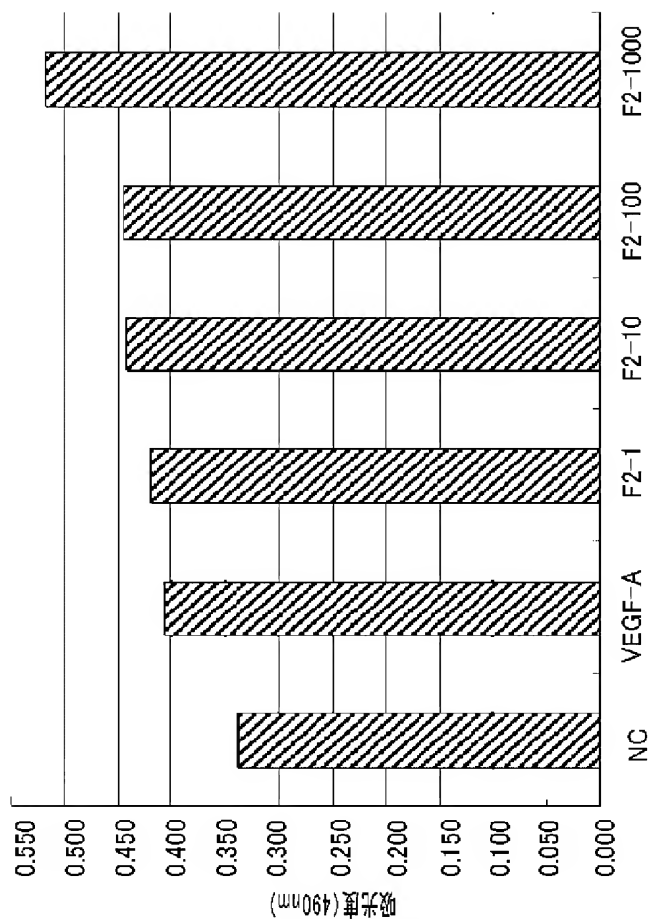
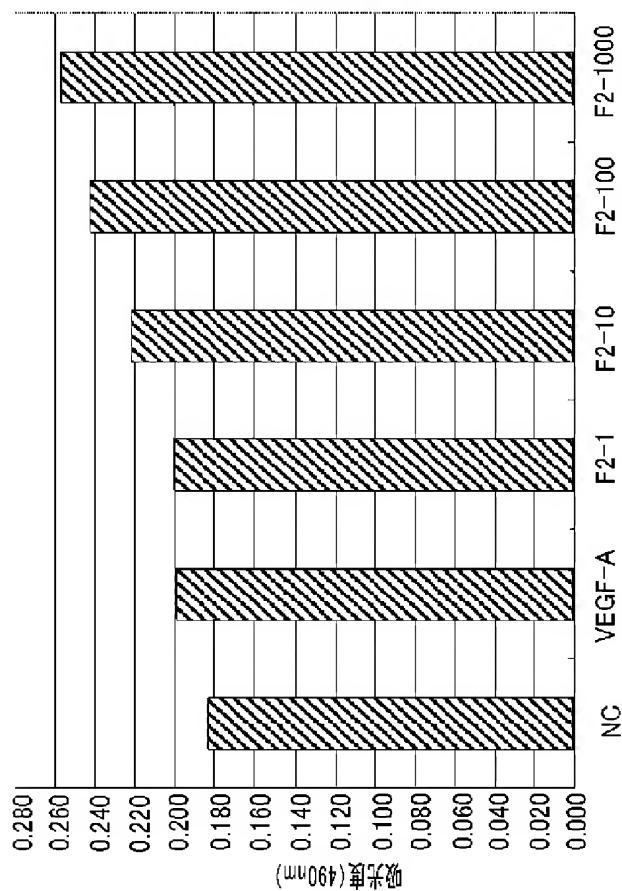
p3743-f2のc-fosプロモーターアッセイ



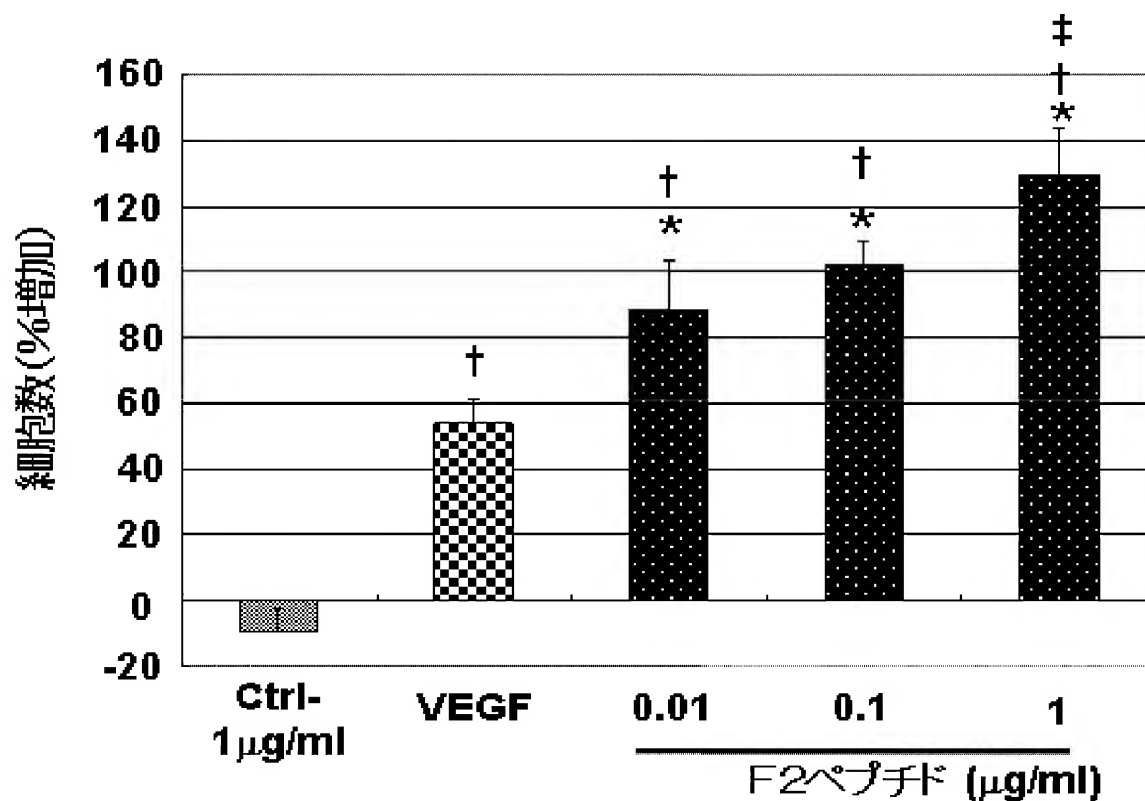
p3743-f1のc-fosプロモーターアッセイ



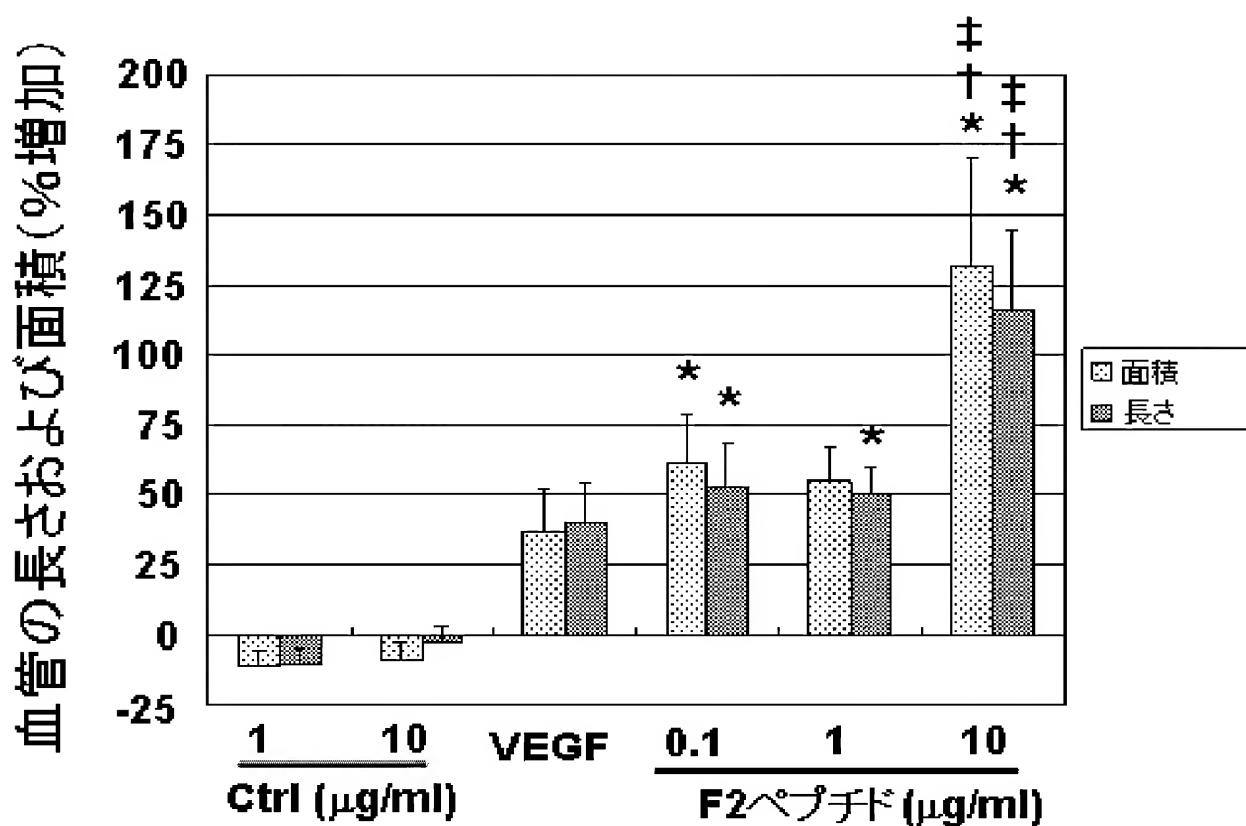
[図9]

F2ペプチドを用いるHAEC 増殖アッセイ
4日目F2ペプチドを用いるHAEC 増殖アッセイ
1日目

[図10]



[図11]



[図12]

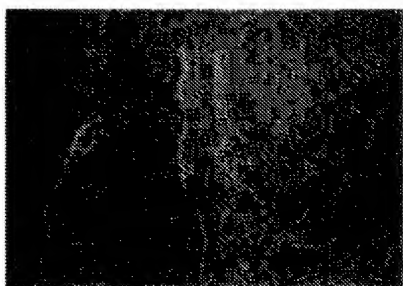


コントロールペプチド

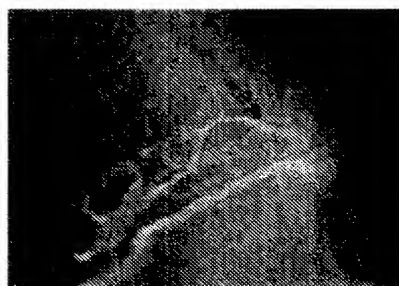


F 2 ペプチド

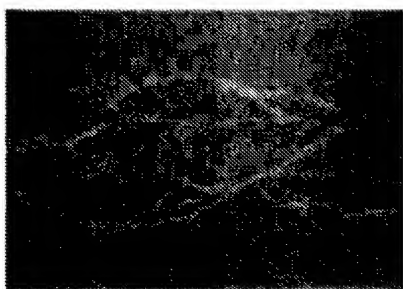
[図13]



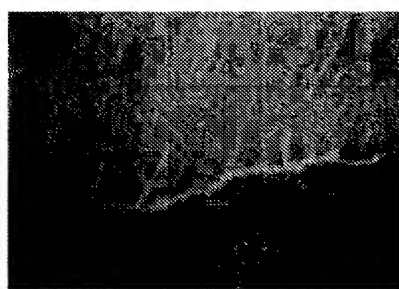
ネガティブコントロール



コントロールペプチド

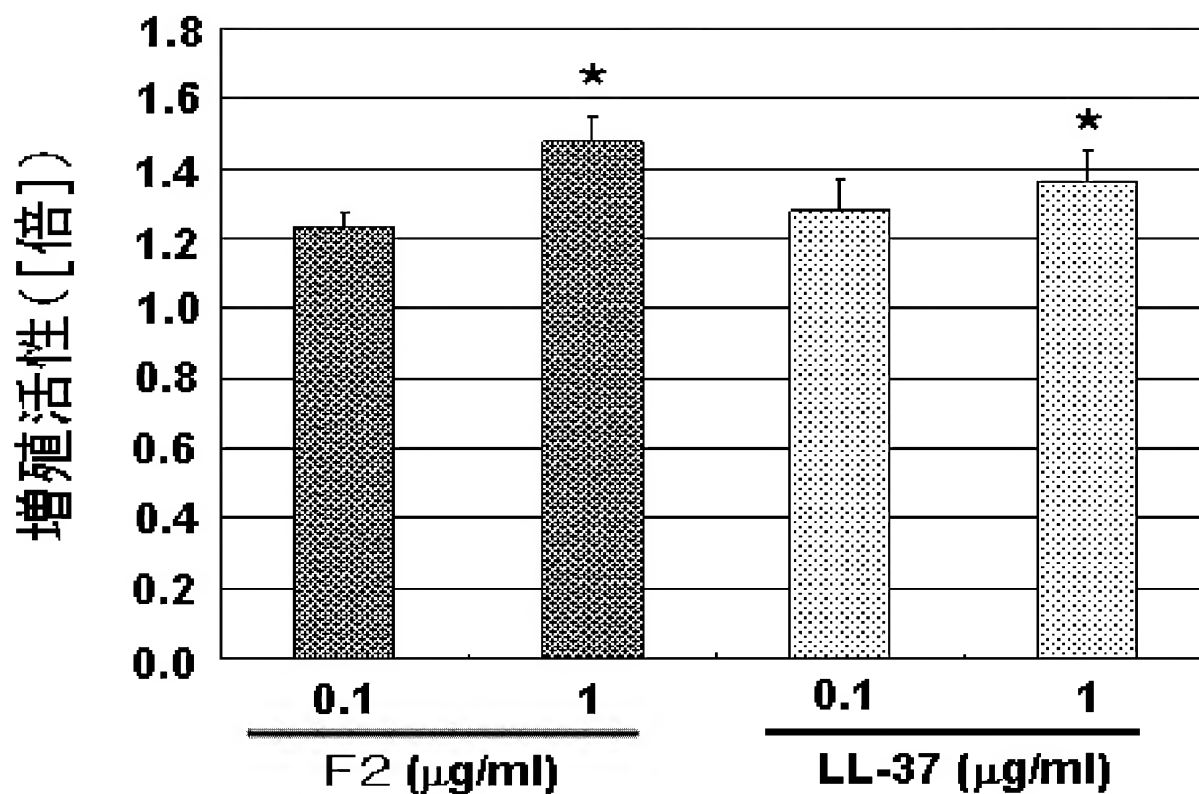


VEGF

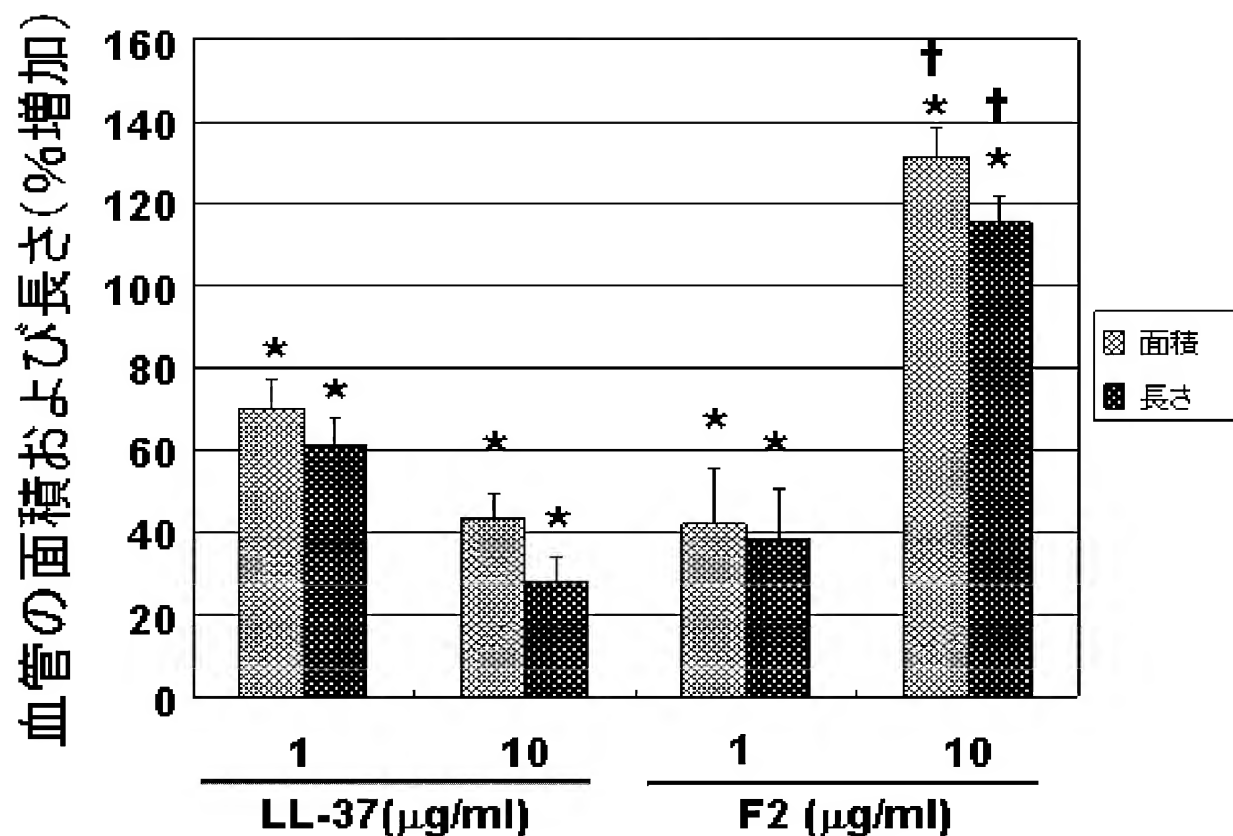


F 2 ペプチド

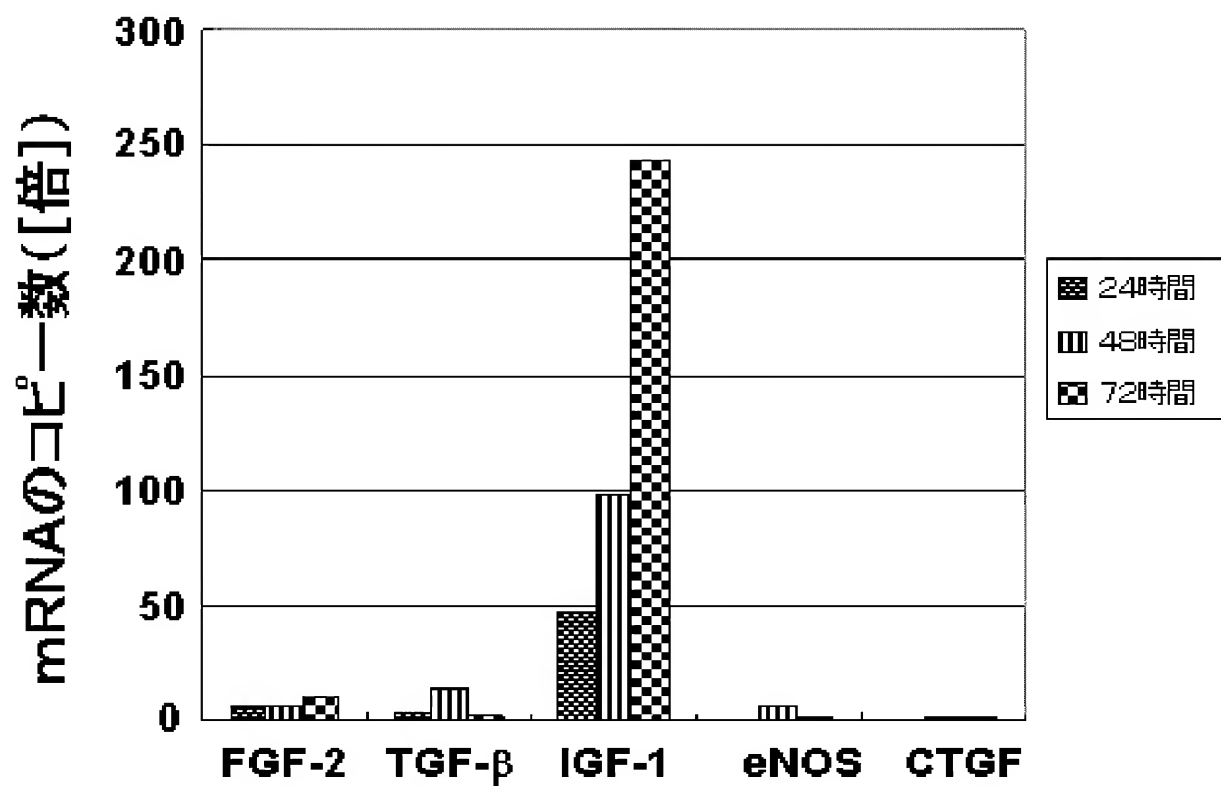
[図14]



[図15]



[図16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004832

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K31/7088, 38/00, 48/00, A61P7/02, 9/00, C07K14/475, C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K31/7088, 38/00, 48/00, A61P7/02, 9/00, C07K14/475, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	US 2002/0137081 A1 (INCYTE GENOMICS, INC.), 26 September, 2002 (26.09.02), Full text; SEQ.ID NO.637 (Family: none)	1-5, 15, 16 6-14, 17-38
<u>X</u> A	NAKAO, M. et al., "Identification of a Gene Coding for a New Squamous Cell Carcinoma Antigen recognized by the CTL", J.Immunol., (2000), Vol.164, pages 2565 to 2574, full text	1-5, 15, 16 6-14, 17-38
P, A	WO 2004/085675 A1 (BIONOMICS LTD.), 07 October, 2004 (07.10.04), Full text; table 2: BNO797 (Family: none)	1-38

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 June, 2005 (09.06.05)Date of mailing of the international search report
28 June, 2005 (28.06.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004832

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: parts of 9 to 14, 17 and 27 to 32
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Among the methods as described in claims 9 to 14, 17 and 27 to 32, the methods involving the steps of providing a tissue undergoing angiogenesis, a tissue causing angiogenesis or vascular endothelial cells from a human subject pertain to methods for treatment of the human body (continued to extra sheet)
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004832

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

by surgery, while the methods of performing angiogenesis or vascular endothelial cell growth in the human body (in vivo) pertain to methods for treatment of the human body by therapy. Thus, these methods relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C12N15/09, A61K31/7088, 38/00, 48/00, A61P7/02, 9/00, C07K14/475, C12N5/10			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C12N15/09, A61K31/7088, 38/00, 48/00, A61P7/02, 9/00, C07K14/475, C12N5/10			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN) CAplus (STN), REGISTRY (STN) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X ----- A	US 2002/0137081 A1, (INCYTE GENOMICS, INC.), 2002.09.26, 全文, SEQ.ID NO.637 (ファミリーなし)	1-5,15,16 ----- 6-14,17-38	
X ----- A	NAKAO, M. et al., "Identification of a Gene Coding for a New Squamous Cell Carcinoma Antigen recognized by the CTL", J.Immunol., (2000), Vol.164, pp.2565-2574, 全文	1-5,15,16 ----- 6-14,17-38	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 09.06.2005		国際調査報告の発送日 23.6.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 伏見 邦彦	4 B 3 3 3 4
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P,A	WO 2004/085675 A1, (BIONOMICS LIMITED), 2004.10.07, 全文, Table.2:BNO797 (ファミリーなし)	1-38

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 9-14, 17, 27-32の一部 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項9-14, 17, 27-32に記載の方法のうち、血管新生する組織、血管新生を生じさせる組織、または、血管内皮細胞を人から提供する工程を含む方法は、手術による人体の処置方法に該当し、血管新生、または、血管内皮細胞の増殖を、人のインビボで行う方法は、治療による人体の処置方法に該当する。したがって、これらは、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。